

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR-INGENIEUR

par

Jean GUERIN

SUJET :

**Variations de la composition de la caséine K bovine.
Contribution à l'étude de sa biosynthèse**

Soutenue publiquement le 10 Mai 1974 devant la commission d'examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS

Examineurs : MM. R. FRENTZ
R. GAY



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551912_0043

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN CHIMIE

par

Jean GUÉZEN

Présentée et soutenue le 14 mai 1974

1974

Variations de la composition de la caséine K bovine.
Contribution à l'étude de sa biosynthèse

Présentée et soutenue le 14 mai 1974

Document communiqué le 10 mai 1974

Présentée et soutenue le 14 mai 1974

Présentée

le 14 mai 1974

Présentée

le 14 mai 1974

à Nancy

LOUDART & CLEMENT
RELIEURS

11, rue Sainte-Anne, 11
Tél. 52.80.09 - NANCY

THÈSE

présentée devant
L'UNIVERSITE DE NANCY I
pour obtenir le titre de
DOCTEUR-INGENIEUR

par
Jean GUERIN

SUJET :

**Variations de la composition de la caséine K bovine.
Contribution à l'étude de sa biosynthèse**

Soutenue publiquement le 10 Mai 1974 devant la commission d'examen

Membres du Jury

Président : M. C. ALAIS
Examineurs : MM. R. FRENTZ
R. GAY

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le titre de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Jean GUERIN



2017

Contributions à l'étude de la biosynthèse
et de la composition de la cascade de l'acide

Séances publiques de 1950 (1950) de la bibliothèque de la ville

1950 DE 428

1950 DE 428
1950 DE 428
1950 DE 428

- AVANT - PROPOS -

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été poursuivis sous la direction de Monsieur le Professeur ALAIS qui a bien voulu patronner cette thèse. Il a su nous montrer que la Recherche pouvait être un métier en même temps qu'une passion, malgré toutes les difficultés que nous avons rencontrées au cours de cette étude.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans l'appui de Monsieur le Professeur P. JOLLES qui a accepté de nous conseiller dans le domaine de l'analyse des protéines et d'effectuer un certain nombre de déterminations dans son laboratoire, à l'Université de Paris VI.

Messieurs les Professeurs R. FRENTZ et R. GAY ont bien voulu juger notre travail et participer au Jury de cette thèse.

Les différents échantillons de lait nous ont été fournis grâce à Monsieur le Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Nancy, et à Monsieur FAIVRE, du Service d'Expérimentation et d'Information (Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Mirecourt).

Le traitement informatique des résultats a pu être réalisé grâce à la collaboration de Monsieur C. MILLIER, de la Station de Biométrie (Institut National de la Recherche Agronomique).

La collaboration permanente des membres du Groupe de Biochimie Appliquée, animée par Monsieur le Professeur C. ALAIS, nous a permis de résoudre un certain nombre de

problèmes et d'élargir notre horizon de recherche.

Nous exprimons à tous ceux qui nous ont aidé, guidé et conseillé, notre vive gratitude et nos remerciements.

P L A N

- AVANT-PROPOS

- INTRODUCTION

- 1 - La caséine entière
- 2 - Composition de la caséine
- 3 - La caséine du colostrum
- 4 - Objet du travail

- MATERIEL et METHODES

- 1 - Lait et caséine
 - 1.1 - Prélèvements de lait
 - 1.2 - Préparation de la caséine entière
 - 1.3 - Préparation de la caséine K
 - 1.4 - Préparation du caséinoglycopeptide
- 2 - Examens électrophorétiques
 - 2.1 - Electrophorèse en gel d'amidon
 - 2.2 - Electrophorèse sur papier sous haute tension
- 3 - Libération d'azote non protéique (NPN) par la chymosine
- 4 - Méthodes de dosage
 - 4.1 - Dosage de l'azote
 - 4.2 - Dosage du phosphore
 - 4.3 - Dosage des oses neutres
 - 4.4 - Dosage des osamines
 - 4.5 - Dosage des osamines N - acétylées
 - 4.6 - Identification des osamines par chromatographie sur résine échangeuse d'ions
 - 4.7 - Dosage de l'acide sialique
 - 4.8 - Dosage des acides aminés
 - 4.9 - Détermination des acides aminés C - terminaux
- 5 - Analyse statistique
- 6 - Annexe : Composition des réactifs et tampons

- RESULTATS

1ère partie : Variation de la composition de la caséine K

- 1 - Composition comparée de la caséine K de 2 troupeaux de race différente
 - 1.1 - Objet de la comparaison
 - 1.2 - Partie peptidique
 - 1.2.1 - "Effet date"
 - 1.2.2 - "Effet troupeau"
 - 1.3 - Partie non peptidique
- 2 - Variation de la composition de la caséine K de deux vaches homozygotes pour les loci K-Cn^A et K-Cn^B
 - 2.1 - Objet de l'étude
 - 2.2 - Partie peptidique
 - 2.2.1 - "Effet date"
 - 2.2.2 - "Effet variant génétique"
 - 2.3 - Partie non peptidique.

2ème partie : La caséine de colostrum

- 1 - Examens électrophorétiques
 - 1.1 - Caséine entière
 - 1.2 - Caséine K
 - 1.3 - Caséinoglycopeptide
- 2 - Composition de la caséine K de colostrum
- 3 - Action de la chymosine sur la caséine de colostrum
- 4 - Composition du caséinoglycopeptide de colostrum
 - 4.1 - Partie peptidique
 - 4.2 - Partie non peptidique
 - 4.2.1 - Variations de sa composition
 - 4.2.2 - Identification des osamines
 - 4.2.3 - Relation entre l'azote libéré par la chymosine et la teneur en acide sialique de la caséine entière.

4.3 - Détermination des acides aminés C - terminaux
- DISCUSSION

1 - Causes d'hétérogénéité et de variation de
composition des protéines

1.1 - Evolution pendant la biosynthèse

1.2 - Modification après la biosynthèse

1.3 - Modification pendant le traitement des
protéines

1.4 - Valeur des résultats analytiques.

2 - Variation de la composition de la caséine K

2.1 - Comparaison de la caséine K provenant
de troupeaux de races différentes

2.2 - Comparaison des variants génétiques
de la caséine K

3 - La caséine de colostrum

- RESUME

- I N T R O D U C T I O N -

1 - LA CASEINE ENTIERE

Le lait de vache contient 3 à 4% de protides, parmi lesquels la caséine qui y tient une place importante. Elle représente en effet de 75 à 80% du total azoté et joue un rôle primordial dans l'alimentation humaine et animale. C'est une source de protéines équilibrées qui font actuellement défaut dans les contrées peu développées. Le 17^e Congrès International de Laiterie (SYDNEY 1970) a mis l'accent sur la nécessité de trouver des sources valables de protéines afin de lutter contre la malnutrition dans le monde et a insisté sur le rôle efficace que pourrait jouer la caséine du lait dans cette lutte.

La caséine a été depuis fort longtemps extraite du lait et transformée en produits de consommation les plus divers, mais ce n'est qu'au 19^e siècle que BRACONNOT (1) a isolé chimiquement la caséine en la précipitant du lait par l'acide acétique. HAMMARSTEN (2-3) considérait la caséine comme une protéine homogène, car l'analyse élémentaire donnait des valeurs constantes, mais un peu plus tard fut émise l'hypothèse d'une hétérogénéité de cette protéine. Différents essais de fractionnement de la caséine furent entrepris par action de l'alcool (4), par action de l'alcool et de l'acide chlorhydrique (5) (6) ou par action de sels (7) (8). C'est seulement en 1939 que MELLANDER (9) montra que la caséine était un ensemble de trois fractions α , β et γ .

La méthode d'électrophorèse en veine liquide, employée par cet auteur, ne permettait pas un fractionnement complet. C'est l'emploi de milieux dissociants qui a permis un inventaire plus complet des constituants de la caséine. Les fractions préparées par précipitation ont

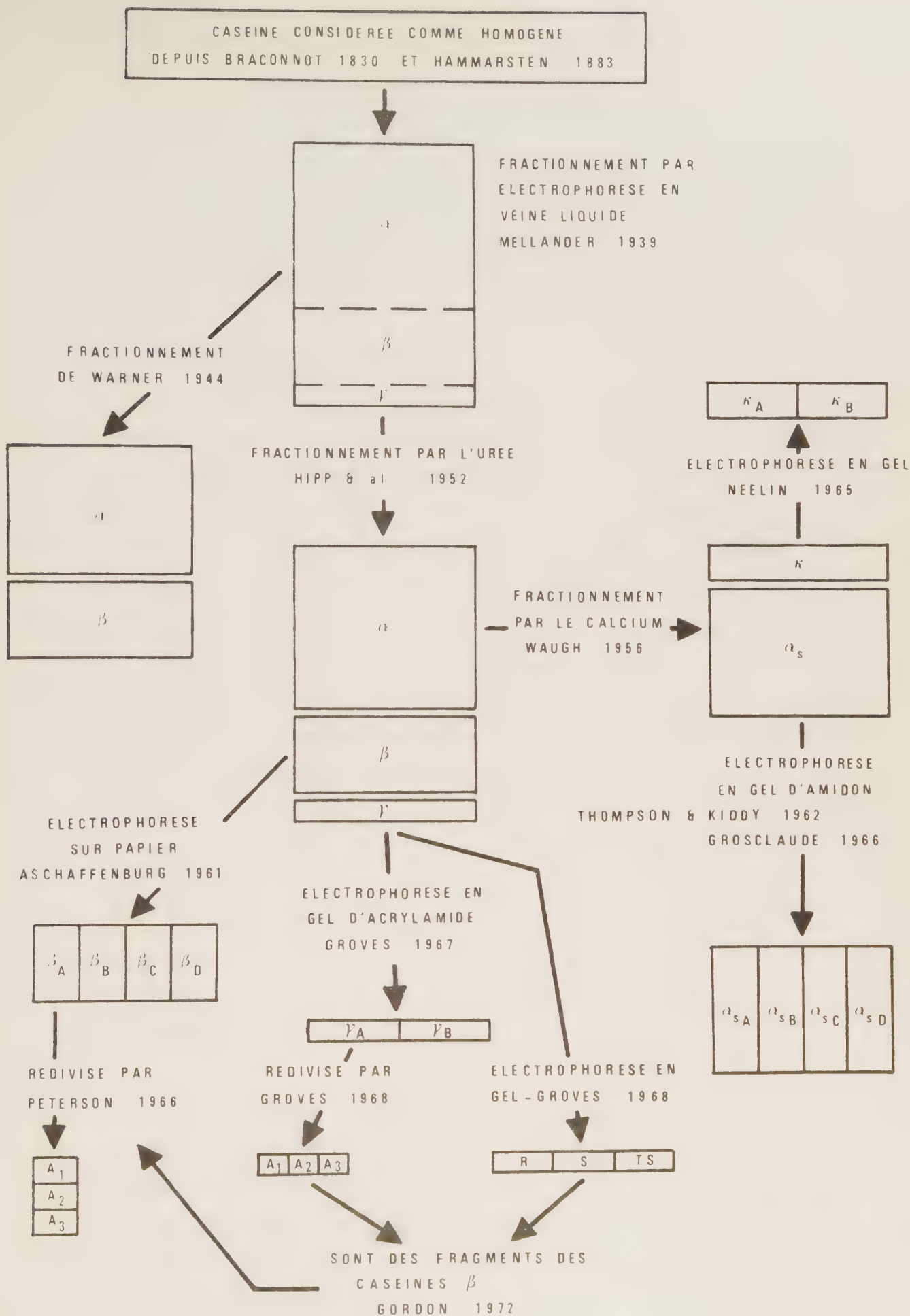


FIGURE 1 : EVOLUTION DES CONNAISSANCES SUR
LA CASEINE BOVINE

ensuite été isolées et subdivisées en de nombreuses autres fractions. La figure 1 montre l'évolution du fractionnement de la caséine entière depuis la découverte de son hétérogénéité par MELLANDER. On remarquera l'existence de variants génétiques pour chaque constituant de la caséine.

2 - COMPOSITION DE LA CASEINE

Différents auteurs ont dosé les acides aminés contenus dans la caséine entière, puis dans chaque fraction après leur purification. Des variations relativement importantes sont apparues au fur et à mesure de la publication des analyses de caséine et certains chercheurs ont été amenés à supposer que la composition chimique des caséines n'était pas fixe mais pouvait varier suivant différents facteurs. GORDON et al. (12) furent parmi les premiers à publier, en 1949, la composition en acides aminés de la caséine de vache. En 1959, KUGENEV (13) montre que la composition de la caséine entière en 9 acides aminés varie avec l'âge et la race des animaux, ainsi qu'avec la saison ; ces variations pourraient s'expliquer par les variations de proportion entre les différentes fractions constituant la caséine entière ; mais il faut souligner le fait que cet auteur utilisait la chromatographie sur papier, qui ne permet pas d'obtenir des résultats précis.

KIERMEIER et KIRCHMEIER (14) ont, en 1963, étudié la composition de 50 échantillons de caséine entière de vache en fonction du temps et de l'alimentation des animaux, et ont constaté une corrélation négative entre les acides aminés essentiels et les acides aminés non essentiels.

Par contre, LINDQVIST (15), étudiant les acides aminés des protéines du lait, n'a pas retrouvé une telle corrélation. FEATHERSTON et al. (16), quant à eux, ont montré que des variations importantes dans l'alimentation des vaches n'influent pas sur la composition en acides aminés des protéines du lait.

Les études précédentes ne portaient que sur la caséine entière.

Par la suite, KIERCHMEIER (17) a étudié la composition stoechiométrique de la caséine et a constaté des variations de la proportion entre les différentes fractions, suivant la race, la période de l'année et le lieu d'élevage. Il a ensuite noté (18) que les variations de la composition stoechiométrique de la caséine (de $\alpha_s 16$, $\beta 5$, $\gamma 0$, $\kappa 3$ à $\alpha_s 6$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\kappa 3$ avec une moyenne de $\alpha_s 9$, $\beta 4$, $\gamma 1$, $\kappa 3$) ne permettent pas d'expliquer complètement les variations de la teneur en acides aminés de la caséine entière. KIERCHMEIER en déduit que la composition des protéines associées pour former la caséine varie en fonction du temps et il a constaté dans la fraction dite "caséinoglycopeptide" (voir plus loin) ce qu'il dénomme des "variants métaboliques" :

Thr 3 Ser 2 Glu 6	→	Thr 6 Ser 3 Glu 2
et Asp 3 Glu 5	→	Asp 2 Glu 6

Ces variants seraient dus, selon lui, à une très large variation dans la spécificité du messenger. Mais KIERCHMEIER utilise l'électrophorèse selon TISELIUS, qui ne permet pas de séparer deux importantes fractions, les caséines α_s et κ . Par dosage de l'acide neuraminique de la caséine entière, il déduit la teneur en caséine K et, par différence, il

obtient la teneur en caséine α_s . Cette méthode de dosage par soustraction est trop approximative pour être retenue. De plus, elle suppose que la teneur en acide neuraminique de la caséine K est constante, ce qui est probablement inexact (19).

Une cause de variation de la composition en acides aminés apparaît dans les travaux de MAJUMDER et GANGULI (20) ; ils ont en effet constaté par la méthode des marqueurs radioactifs, qu'il y avait incorporation d'acides aminés marqués (sérine et leucine) dans les protéines du lait après la traite, ce qui laisserait supposer que la biosynthèse des protéines peut continuer à l'extérieur de la mamelle.

JOLLES et al. (21) ont remarqué que la composition en acides aminés du "caséino-glycopeptide", qui est la moitié C- terminale de la caséine K (détachée par la chymosine (ou présure E.C. 3.4.4.3)) était très difficile à obtenir avec précision, car elle varie légèrement d'un lot à l'autre, même après plusieurs purifications, en particulier pour la sérine, la thréonine, la proline et l'acide glutamique ou glutamine. Cette observation est en faveur de l'hypothèse d'une variation naturelle de la composition chimique. Cependant il faut signaler que la présence de glucides dans la molécule de caséine K rend plus malaisée l'analyse des acides aminés.

3 - LA CASEINE DU COLOSTRUM

L'évolution de la composition du colostrum est très rapide et on constate que, 10 à 20 jours environ après la parturition, la sécrétion de la glande mammaire donne un lait de composition normale (22). Le tableau 1 résume les différences moyennes que l'on peut trouver entre le colostrum et le lait.

Tableau 1
Composition moyenne du colostrum et du lait
(en p. 1000) (23)

	COLOSTRUM (lère traite)	LAIT
- Densité	1060	1032
- Extrait sec	274	131
- Matières grasses	50	39
- Lactose	29	49
- Sels	12	8
- Matières azotées totales	130	34
- dont caséine	57	28

Les protéines du colostrum ont été étudiées surtout pour leurs caractères immunologiques liés principalement aux globulines, mais très peu de chercheurs se sont intéressés aux caséines de la période post partum, sinon du point de vue de la quantité de caséine entière secrétée par les animaux (24 - 25 - 26).

RIBADEAU-DUMAS et VEAUX (27) ont essayé de fractionner la caséine entière de colostrum par centrifugation. Les teneurs en acide neuraminique et en azote non protéique libéré de ces fractions par la chymosine varient suivant la taille des micelles ; la fraction non centrifugeable (caséine soluble) est la plus riche en ces deux composants. Ces auteurs en concluent que la caséine de colostrum serait riche en caséine K (37% de la caséine entière).

KIM et al. (28) ont montré que la teneur en acide sialique du colostrum est élevée au moment de la mise-bas, puis diminue. Ces auteurs constatent, en fractionnant des

protéines du colostrum sur diéthylamino-éthyl-cellulose, que la teneur du colostrum en caséine K semble augmenter après la mise-bas, ce qui contredit l'hypothèse des précédents auteurs (27). Par microscopie électronique, KNOOP et WORTMANN (29) ont montré que les micelles de caséine ne sont pas formées dans le colostrum alors qu'elles le sont 5 jours après la parturition.

L'étude de la caséine de colostrum présente un intérêt certain du point de vue biochimique, mais elle doit aussi permettre de faire avancer nos connaissances sur la "caséinogénèse", c'est-à-dire la biosynthèse de la caséine au début de la sécrétion lactée, à partir de la parturition. Ce terme, la "caséinogénèse", nous a inspiré par l'ouvrage de REYNOLDS et FOLLEY (30) : "Lactogénésis - the initiation of milk secretion at parturition". La caséinogénèse semble assez peu étudiée du point de vue biochimique car la plupart des études publiées font appel à la microscopie électronique (31) ou considèrent l'action d'hormones sur la caséinogénèse (32).

4 - OBJET DU TRAVAIL

Notre étude sur la caséine K a pour but de déterminer si la variation de sa composition, remarquée par différents auteurs, est effective au cours du temps. Nous avons comparé deux races de vache (race Pie Rouge et Frisonne Française Pie Noire). Nous avons aussi comparé les variants génétiques K_A et K_B en étudiant la composition des caséines K provenant des vaches homozygotes pour cette caséine.

Nous avons étendu cette étude à la caséine K de colostrum, afin de voir si, dès le début de la lactation, cette caséine est totalement formée et si sa composition est identique à celle de la caséine K de lait normal.

Notre étude a porté soit sur la caséine K isolée de la caséine entière, soit sur la partie de cette caséine dénommée "caséino-glycopeptide".

En effet, GARNIER (33) puis WAKE (34) ont confirmé l'hypothèse émise par WAUGH et von HIPPEL (35) selon laquelle la chymosine agit spécifiquement sur la caséine K en libérant le caséino-glycopeptide. Ce peptide résulte de la coupure de la liaison Phe - Met au milieu de la molécule et représente la partie C- terminale de la caséine K (36- 39). Il contient tous les sucres de cette caséine (40).

Nous avons préféré étudier la caséine K par le biais du caséino-glycopeptide car sa préparation est beaucoup plus facile et plus rapide que celle de la caséine K.

Dans ces conditions d'action de l'enzyme, les caséines α_s et β ne subissent pas de protéolyse.

Dans la première partie, nous décrirons les méthodes de préparation des différentes caséines et les méthodes de dosage et d'analyse.

Dans la deuxième partie, nous exposerons les résultats de ces travaux. Un premier chapitre traitera de la caséine K et du caséino-glycopeptide de caséine normale. Un second chapitre traitera de la caséine K du colostrum et de son évolution pendant la phase colostrale de la lactation.

- M A T E R I E L e t M E T H O D E S -

NB. - La composition des réactifs, désignés par une lettre, est indiquée en annexe, à la fin de cette partie.

1 - LAIT et CASEINE

1.1 Prélèvements de lait

Les laits de mélange de vaches de race Frisonne Française Pie Noire (F.F.P.N.) et de race Pie Rouge de l'Est (P.R.E.) sont prélevés sur la traite du soir de troupeaux d'une soixantaine d'animaux chacun.

Les laits individuels de vaches homozygotes pour la caséine K ont été prélevés sur la traite du soir de vaches Frisones Françaises Pie Noire. La détection d'homogénéité de la caséine K a été faite par électrophorèse en gel d'amidon directement avec le lait écrémé.

Les prélèvements ont été effectués approximativement tous les trois mois.

1.2. Préparation de la caséine entière

La caséine entière a été préparée selon la méthode de HAMMARSTEN modifiée par NITSCHMANN (41).

Quatre litres de lait écrémé deux fois par centrifugation et chauffé à 40°C sont amenés à pH 4,6 avec HCl 1N. L'ensemble est centrifugé à 3500 t/mn. pendant 15 minutes. Le précipité est lavé 3 fois à l'eau distillée puis dissout en amenant la suspension de caséine à pH 7,0 par addition lente de NaOH 1N. La caséine est reprécipitée à pH 4,6 avec HCl 1N, lavée 3 fois à l'eau distillée puis redissoute dans le minimum d'eau par addition lente de NaOH 1N jusqu'à pH 7,0. La solution de caséine est filtrée sur verre fritté puis lyophilisée.

Pour préparer de la caséine entière de colostrum nous avons été obligés de modifier quelque peu le protocole utilisé pour le lait. En effet, la caséine de colostrum ne floccule pas quand elle est acidifiée à son pH isoélectrique. Ce phénomène a été remarqué par ALAIS et JOLLES lors de la préparation de caséine humaine (42).

Le colostrum écrémé deux fois est dilué en ajoutant 2 volumes d'eau distillée à 40°C à un volume de colostrum. On amène alors le mélange à pH 4,6 par addition d'HCl N et on maintient le mélange à 40° C jusqu'à précipitation. On opère ensuite comme pour le lait.

1.3 - Préparation de la caséine K

La caséine K était habituellement préparée au Laboratoire par précipitation à l'acétate d'ammonium en milieu alcoolique suivant la méthode de Mc KENZIE et WAKE (43). Cette méthode est assez laborieuse, aussi avons nous préféré utiliser, pour la préparation de petites quantités de caséine K, la méthode chromatographique décrite par YAGUCHI et al. (44) que nous avons légèrement modifiée.

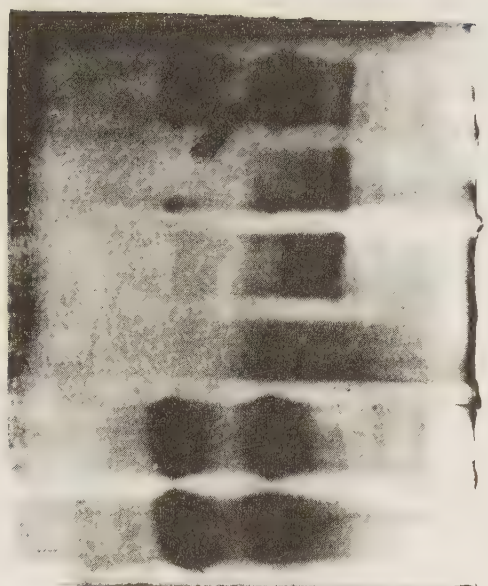
On utilise le Sephadex G- 150 dans du tampon Tris 0,005 M - citrate (pH 8,6) contenant 6M d'urée (tampon TCU), dans une colonne LKB de 3,2 x 95 cm. La colonne est stabilisée en faisant passer de bas en haut, avec un débit de 15-20 ml/h, un volume de tampon TCU équivalent à 2 fois le volume du gel. L'échantillon (2g.) de caséine entière à fractionner est dissout dans 25 ml de tampon TCU et la solution est centrifugée pendant 30 minutes à 2°C et 125000 x g (Spinco Modèle L-2, Rotor n° 50). La centrifugation sépare une couche supérieure blanche, composée de

lipides résiduels, une couche liquide transparente et un léger culot. Dix ml du liquide transparent sont déposés à la base de la colonne et élués à la température ambiante par le tampon TCU avec un débit de 20 ml/h. L'effluent passe dans un absorptiomètre UV et est partiellement dialysé dans un dialyseur Technicon contre de l'eau déminéralisée. 950 ml d'effluent sont collectés par fractions de 5ml. Les fractions rassemblées sont dialysées contre du NaCl 0,005 M jusqu'à ce que les eaux de dialyse ne contiennent plus d'urée. Les fractions obtenues sont lyophilisées puis contrôlées par électrophorèse en gel d'amidon (Figure 2).

1.4 - Préparation du caséino-glycopeptide

Nous avons utilisé la méthode décrite par ALAIS et JOLLES (45).

On dissout 25 g de caséine entière lyophilisée dans un litre d'eau distillée et on ajuste le pH de cette solution à 6,7. On ajoute à la solution à 25°C, 0,675 μ g de chymosine cristallisée par ml de solution (rapport enzyme-substrat 1 : 37000). On arrête la réaction au bout de 30 minutes en ajoutant dans le mélange 2 l. d'acide trichloracétique à 18%, avec une agitation vive. La concentration finale est de 12%. Après quelques minutes, on fait une première filtration sur Büchner suivie d'une deuxième sur verre fritté n° 4. Ensuite on effectue 5 extractions successives à l'éther éthylique, en évitant la formation de couches visqueuses intermédiaires assez stables. Après extraction, la phase aqueuse est concentrée 6 fois par évaporateur rotatif sous vide à 35° C et dialysée longuement contre de l'eau distillée. La solution est finalement concentrée à 40 ml, approximativement, puis lyophilisée.



— Caséine entière

— Fraction A

— " B

— " C

— " D

— " E

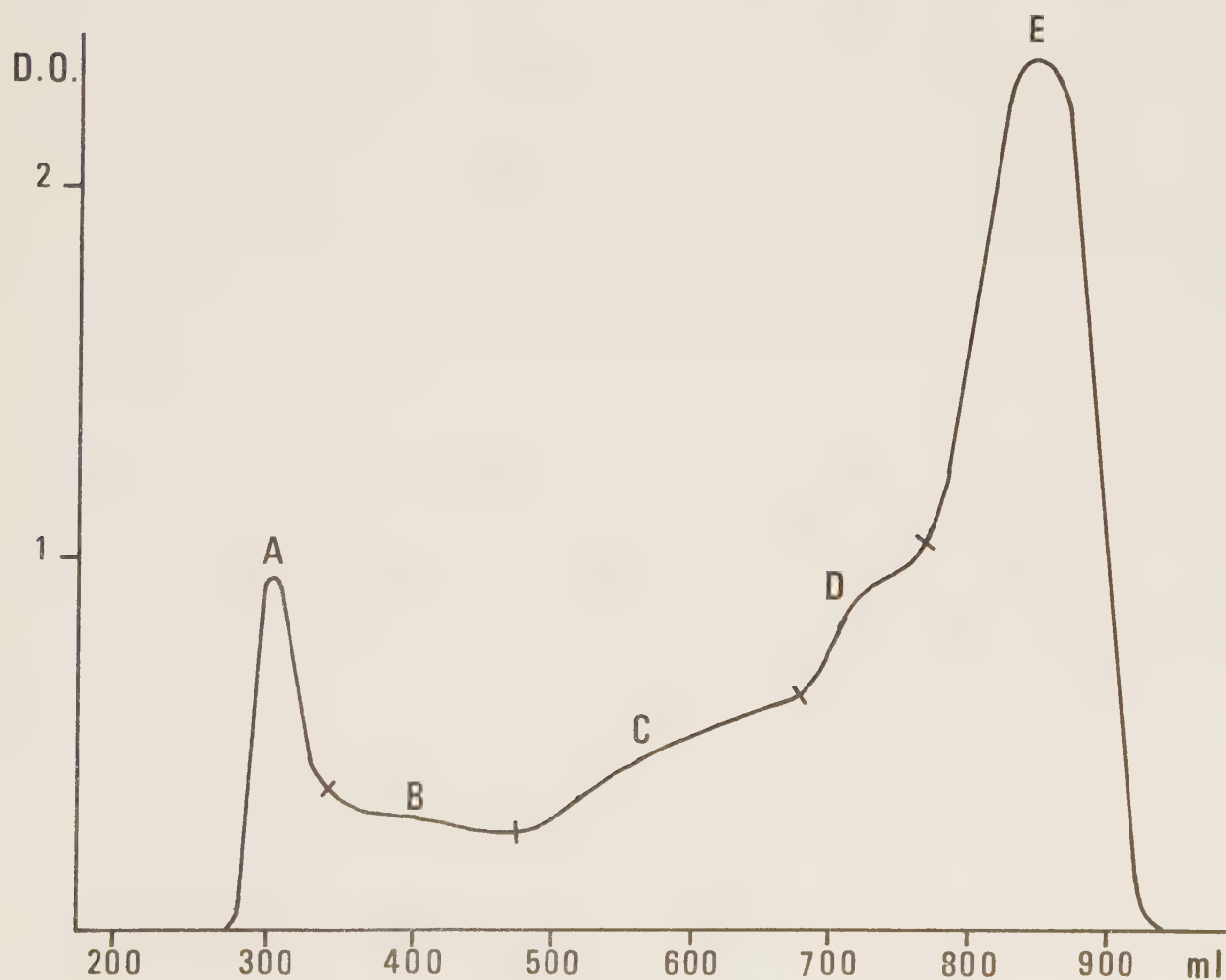


Figure 2 - Préparation de la caséine K par chromatographie sur gel de Sephadex G 150 selon Yaguchi et al.

On obtient un rendement de 1,0 à 1,3%. La pureté du produit est vérifiée par électrophorèse sous haute tension.

2 - EXAMENS ELECTROPHORETIQUES

2.1 - Electrophorèse en gel d'amidon

Nous avons suivi la technique de WAKE et BALDWIN (46) utilisant le système de tampons discontinus de POULIK (a) (47) dans un gel à 11,4% d'amidon contenant 7M d'urée et en présence de 2-mercapto-éthanol selon NEELIN (48).

Le gel se prépare 24 heures avant l'électrophorèse. 55g d'amidon partiellement hydrolysé sont mis en suspension dans 246 ml d'eau et 42 ml de tampon Tris - citrate pH 8,6. On amène doucement à ébullition en agitant légèrement. Quand le gel atteint son minimum de viscosité, le chauffage est arrêté et on ajoute 176,5g d'urée et 0,82 ml de mercaptoéthanol en agitant vigoureusement. On dégaze le gel tiède, on le coule dans les moules en plexiglas et on le laisse 24 heures sous atmosphère saturée d'eau.

Les échantillons sont dissouts dans 0,25ml d'une solution d'urée 7M à laquelle on ajoute 2 gouttes de 2-mercaptoéthanol. Les dépôts sont faits à l'aide de petits morceaux de papier épais (WHATMAN 3 MM) imprégnés de l'échantillon à étudier et inclus dans le gel. Lors de la migration, la plaque de gel, recouverte d'une feuille de Parafilm, est reliée par des ponts en papier aux bacs à électrodes contenant le tampon acide borique - Na OH pH 8,6. L'électrophorèse est poursuivie durant 16 heures sous une tension de 14 V/cm à une température de 4°C.

Après migration, le gel est tranché dans son épaisseur en 3 plaques que l'on colore par le Noir Amido (b). La décoloration est faite par un mélange méthanol-eau-acide acétique (5 : 5 : 1) additionné de 10% de glycérol.

2.2. - Electrophorèse sur papier sous haute tension

L'électrophorèse est faite sur papier Whatman 1 dans un dispositif spécial en plexiglas refroidi par l'eau.

La substance à analyser est dissoute dans l'eau de façon à obtenir une solution à 2% et on en dépose 10 à 20 μ l au milieu de la feuille de papier, à côté de 5 μ l d'un marqueur contenant 0,02 M de glycine, d'arginine et d'acide glutamique. On utilise un tampon pyridine pH 6,5 (c) et on applique une tension de 20V/cm pendant 1 heure 30. Le papier est séché puis on pulvérise le réactif à la ninhydrine (d).

La réaction s'effectue à l'étuve à 100°C pendant 5 minutes.

L'arginine indique la charge -1, la glycine la charge 0 et l'acide glutamique la charge + 1.

3 - LIBERATION D'AZOTE NON PROTEIQUE (NPN) PAR LA CHYMOSINE

ALAIS et al. (49) ont montré que l'action de la chymosine sur des substrats contenant de la caséine K entraîne dans un premier temps la libération du caséino-glycopeptide soluble dans l'acide trichloracétique à 12%. L'étude de la quantité d'azote libérée dans le filtrat trichloracétique au bout de 30 minutes d'action de la chymosine donne une indication sur la teneur en caséine K du substrat étudié.

Nous avons opéré de la manière suivante :

Sur une solution de caséine entière à 2% (pH 6,7), on fait agir une solution de chymosine cristallisée (0,675 μ g/ml de solution de caséine) à 25° C. Après 30 minutes, on arrête la réaction en ajoutant un volume égal de TCA 24%. On laisse agir quelques minutes et on filtre sur papier. On dose l'azote (NPN) directement sur le filtrat trichloracétique. Parallèlement, on effectue un blanc -(NPN-O)- sans enzyme.

L'azote libéré par la chymosine est donné par la différence NPN - NPN O. Les résultats sont exprimés en g d'azote libéré par la chymosine pour 100 g d'azote caséinique.

4 - METHODES DE DOSAGE

4.1 - Dosage_de l'azote

Nous avons dosé l'azote par micro-analyse KJELDAHL d'après la méthode de PREGL décrite par FRIEDRICH (50).

La solution à doser est minéralisée par l'acide sulfurique concentré (1 ml) en présence de catalyseur (e). La distillation de l'ammoniac est effectuée dans un appareil Büchi. L'ammoniac distillé est reçu dans une solution à 1% d'acide borique contenant un indicateur mixte (f) au rouge de méthyle. L'ammoniac recueilli est neutralisé par une solution d'acide sulfurique 0,01 N. Pour le dosage de l'azote caséinique, la minéralisation est faite avec 1 ml d'une solution de caséine à 0,2% et pour l'azote non protéique, la minéralisation est effectuée sur 2ml de filtrat trichloracétique.

4.2 - Dosage_du phosphore

Le phosphore total est dosé, après minéralisation, par

la méthode de FISKE et SUBBAROW modifiée par BAMANN et al. (51), dans laquelle le bleu de molybdène est obtenu par action de l'acide amino- 1 hydroxy - 2 - naphthalène sulfonique 4 et du bisulfite de sodium. La méthode convient pour des teneurs en phosphore de 4 à 30 μg .

La minéralisation de l'échantillon est effectuée à 150° C en présence de 0,5 ml d'acide sulfurique 10N et de quelques gouttes d'eau oxygénée à 110 volumes. Au produit de la digestion sont ajoutés 7 ml d'eau distillée, 0,5 ml d'une solution de molybdate d'ammonium à 2,5% et 0,5 ml du réactif réducteur (h). On agite et on laisse la coloration se stabiliser à l'obscurité pendant plusieurs heures. L'absorption à 650 nm est comparée à celle de solutions étalons de phosphate monopotassique.

4.3 - Dosage des oses neutres

Nous avons utilisé la méthode de dosage colorimétrique qui utilise la réaction des oses avec l'orcinol, décrite par SCHULTZE et al. (52).

La substance à analyser est hydrolysée pendant 3 heures à 100° C en présence d'HCl N dans des tubes bouchés à l'émeri. A 2 ml d'hydrolysate, on ajoute 2ml de réactif à l'orcinol (i) et 15 ml d'acide sulfurique 70,5% ($d = 1,616$). On agite et on développe la coloration pendant 15 minutes au bain-marie à 80°C, à l'obscurité. On refroidit 10 minutes dans l'eau glacée et on mesure l'absorption à 425 nm. La gamme de référence est une solution de galactose de 5 à 100 μg .

4.4 - Dosage des osamines

Nous avons utilisé la méthode d'ELSON et MORGAN modifiée par RONDLE et MORGAN (53).

La substance à analyser est hydrolysée à 100°C

pendant 3 heures dans l'acide chlorhydrique 2N. Dans un tube gradué, on mesure 1 ml d'hydrolysate, on ajoute une goutte de phénolphthaléine et de la soude 2 N jusqu'à virage au rose. On décolore par une goutte d'acide chlorhydrique N. On ajoute 1 ml de réactif à l'acétylacétone (j) on complète à 4 ml avec de l'eau distillée et on porte au bain-marie à 100° C pendant 20 minutes. On refroidit, on ajoute 5 ml d'éthanol absolu et 1 ml de réactif d'Ehrlich (k). On développe la coloration au bain-marie à 70° C pendant 20 minutes, on refroidit et on mesure l'absorption à 520 nm. La gamme de référence est une solution de chlorhydrate de glucosamine de 10 à 100 µg.

4.5 - Dosage des osamines N - acétylés

Nous avons utilisé la méthode de REISSIG modifiée par GHUYSEN et SALTON (54). Elle est appliquée directement à la substance, sans hydrolyse préalable. La formation des chromogènes n'est possible que si le 4ème C de l'osamine est libre. La coloration des polysaccharides aminés est plus lente que celle des osamines libres ; on doit donc chauffer la substance plus longtemps que la gamme étalon.

A 0,5 ml de la solution à doser (contenant environ 2 mg. de substance), on ajoute 0,5 ml de tétraborate de sodium (l). Les tubes sont bouchés et placés 20 minutes (3 minutes pour la gamme témoin) dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement, on ajoute 2,5 ml de réactif d'EHRlich (m) puis les tubes sont gardés 20 minutes à 37° C. On mesure l'absorption à 585 nm. La gamme étalon contient de 5 à 30 µg de N-acetylglucosamine.

4.6 - Identification des osamines par chromatographie sur résine échangeuse d'ions

Nous avons utilisé la méthode de séparation des hexosamines sur colonne d'échangeurs de cations proposée par GARDELL (55).

L'hydrolysate de caséino-glycopeptide (mêmes conditions que pour le dosage) est séché sur CaCl_2 puis repris par 3 fois 0,5 ml d'HCl 0,33 N. L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne de résine échangeuse de cations (Dowex 50 W - X8 ; 200 - 400 mesh ; 1 x 100 cm) préalablement régénérée par l'acide chlorhydrique 4 N et lavée avec 100 ml d'acide chlorhydrique 0,33 N. Les osamines sont éluées par l'acide chlorhydrique 0,33 N et dosées après neutralisation selon la méthode décrite ci-dessus. La glucosamine est éluée de la colonne avant la galactosamine.

4.7 - Dosage de l'acide sialique

Nous avons utilisé la méthode décrite par WARREN (56) après hydrolyse selon les indications de SVENNERHOLM (57).

La substance à analyser est hydrolysée à 85° C pendant une heure en présence d'acide sulfurique 0,1 N. Dans un tube à centrifuger, on mesure 0,2 ml d'hydrolysate (contenant au maximum 0,05 μM d'acide N- acétylneuraminique) et 0,1 ml de la solution de métapériodate (n). On agite et on laisse reposer 20 minutes à la température ambiante. Ensuite on ajoute 1 ml de la solution d'arsénite (p) et on agite jusqu'à disparition de la coloration brune fugace. On ajoute alors 3 ml de la solution d'acide thiobarbiturique (q), on couvre d'une bille de verre et on porte au bain-marie à 100° C pendant 15 minutes. Après refroidissement, on extrait le pigment coloré avec 4,3 ml de cyclohexanone et on mesure l'absorption à 549 nm. La gamme de

référence est une solution d'acide N - acétylneuraminique de 3 à 15 μ g.

4.8 - Dosage des acides aminés

Les acides aminés ont été dosés, après hydrolyse totale, avec un Autoanalyzer Technicon suivant la méthode de PIEZ et MORRIS (58). 0,3 mg de protéines sont hydrolysés dans des tubes scellés sous vide en présence de 0,5 ml d'acide chlorhydrique 6 N pendant 18 heures à 110° C. L'hydrolysate est amené à sec dans un dessiccateur en présence de soude et de chlorure de calcium. L'hydrolysate est repris par du tampon citrate (pH 2,2) et déposé sur la colonne de résine. Les acides aminés sont détectés par réaction à la ninhydrine.

4.9 - Détermination des acides aminés C - terminaux

Le caséino-glycopeptide est soumis à l'action de la carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1) pendant une heure à 37°C dans le bicarbonate d'ammonium 0,1 M (rapport enzyme/substrat = 1/50). La réaction est arrêtée en acidifiant. Le mélange réactionnel est amené à sec puis l'ensemble est repris par du tampon pH 2,2 et soumis à une analyse en acides aminés.

5 - ANALYSE STATISTIQUE

Chaque analyse d'acides aminés a été répétée 2 ou 3 fois. Les résultats ont été traités sur ordinateur I.B.M. 1130. L'estimation de la variation des teneurs en acides aminés a été faite pour chaque troupeau dans le cas des caséino-glycopeptides et chaque vache dans le cas des caséines K par analyse de la variance à un facteur contrôlé. La comparaison entre troupeaux et entre variants génétiques a été faite par analyse de variance hiérarchique. Cette

méthode statistique, schématisée dans la figure 3, permet, quand on se trouve en présence de plusieurs facteurs de variation hiérarchisés, d'attribuer à chacun de ces facteurs la part de la variation qui lui est propre. Dans notre cas, il y a 3 facteurs de variation : le facteur caséine K ou troupeau possédant 2 niveaux de variation, le facteur date possédant 4 ou 5 niveaux de variation et le facteur analyse possédant 2 ou 3 niveaux de variation.

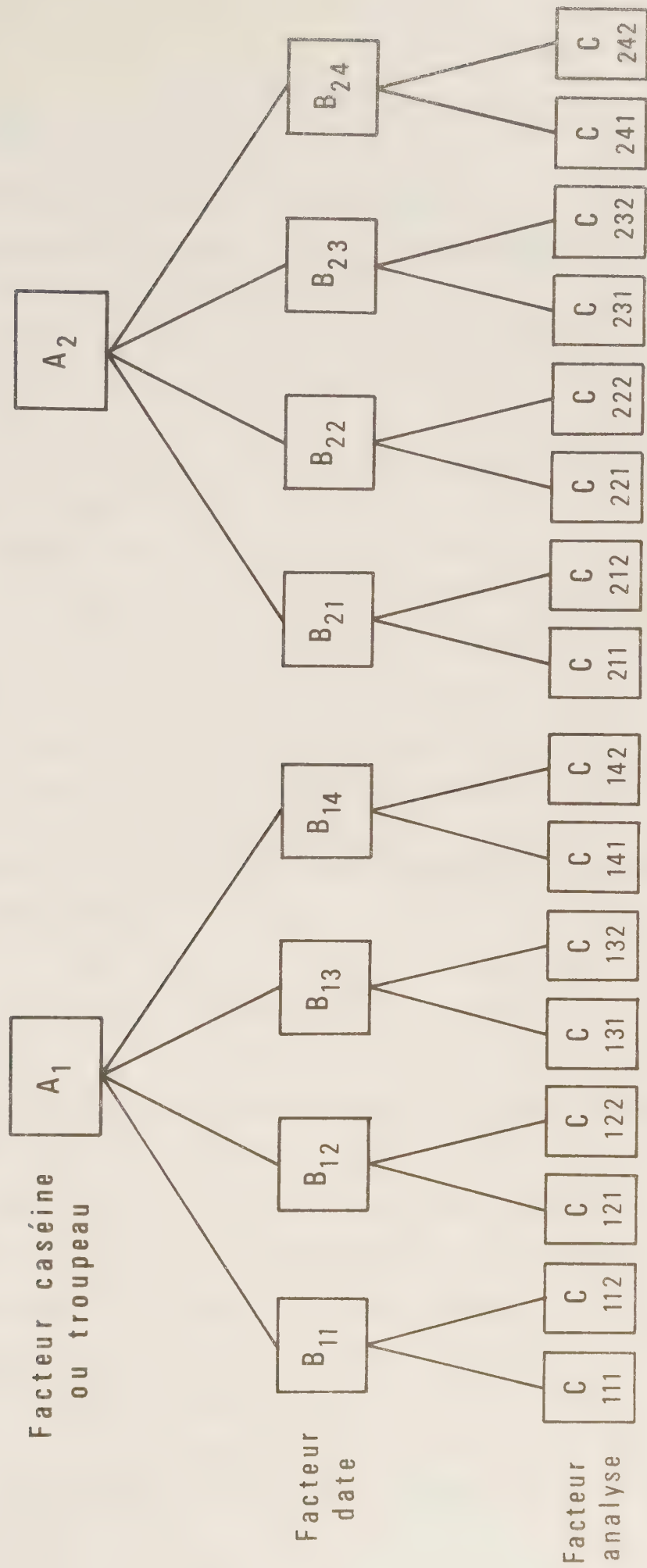


Figure 3 - Schéma illustrant l'analyse de variance hiérarchique.

6 - ANNEXECOMPOSITION DES REACTIFS et TAMPONSa) - Système de tampons discontinus de Poulik (47)

- Tampon Tris-citrate pH 8.6 pour gel

Dissoudre 92,06 g de Tris (hydroxymethyl) amino-méthane dans 1 l. d'eau. Ajuster le pH à 8,6 avec de l'acide citrique.

Ce tampon peut être conservé au froid avec un cristal de thymol

- Tampon borate pour bacs à électrodes

Dissoudre 18,6 g d'acide borique dans 1 l. d'eau. Ajuster le pH à 8,6 avec de la soude concentrée.

b) - Solution colorante pour gel d'amidon

On effectue une solution saturée de Noir Amido 10 B dans le mélange méthanol-eau-acide acétique (5 : 5 : 1)

c) - Tampon pyridine pH 6,5 pour électrophorèse sous haute tension

- | | |
|--------------------------|--------|
| - Pyridine | 100 ml |
| - Eau distillée | 900 ml |
| - Acide acétique glacial | 4 ml |

d) - Réactif à la ninhydrine pour électrophorèse sous haute tension

Dissoudre 1 g de ninhydrine dans 10 ml d'eau. Ajouter 5 ml d'acide acétique et 100 ml d'acétone.

e) - Catalyseur de minéralisation Kjeldahl

Broyer ensemble :

- | | |
|-------------------------------------|-------|
| - Sélénium métal, en poudre | 1 g. |
| - Sulfate ferreux, cristallisé | 5 g. |
| - Sulfate de potassium, cristallisé | 32 g. |

f) - Réactif indicateur pour fixer l'ammoniac distillé

- Acide borique	10 g.
- Ethanol absolu	200 ml
- Eau distillée	750 ml

Amener à dissolution et ajouter 10 ml d'indicateur mixte (g). Si besoin est, ajouter un peu de soude 0,1N pour obtenir une coloration faiblement rougeâtre et compléter à 1000 ml.

g) - Indicateur mixte

Dissoudre dans 100 ml d'éthanol absolu

- vert de bromocresol	0,033 g
- rouge de méthyle	0,066 g

h) - Réactif réducteur pour le dosage du phosphore

Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée

- Métabisulfite de sodium cristallisé	30 g
- Sulfite de sodium cristallisé	1 g

Dissoudre dans 50 ml d'eau distillée

- Acide amino- 1 - hydroxy -2- naphtalène sulfonique 4	0,5 g
---	-------

Mélanger les deux solutions, jauger à 200 ml, laisser reposer 24 heures à l'obscurité et filtrer.

i) - Réactif à l'orcinol

Dissoudre 2 g d'orcinol dans 50 ml d'eau et compléter à 100 ml avec de l'acide sulfurique 53% ($d = 1,425$)

j) - Réactif à l'acétylacétone

Dissoudre 1 ml d'acétylacétone dans 50 ml d'une solution de carbonate de sodium 0,5 N.

k) - Réactif d'Ehrlich

Dissoudre 0,8 g de p - diméthylaminobenzaldehyde dans 30 ml d'éthanol absolu. Ajouter 30 ml d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,18$).

l) - Tétraborate de sodium, 10 H₂ O 19 g/lm) - Réactif d'Ehrlich pour le dosage des N - acetylosamines

p - diméthylaminobenzaldehyde	1 g
Acide acétique	98 ml
Acide chlorhydrique fumant	2 ml

n) - Solution de métapériodate de sodium 0,2 M dans l'acide phosphorique 9 M.p) - Solution d'arsénite de sodium à 10 g pour 100 ml d'une solution 0,5 M de sulfate de sodium dans l'acide sulfurique 0,1 Nq) - Solution d'acide thiobarbiturique à 0,6 g pour 100 ml d'une solution de sulfate de sodium 0,5 M

- R E S U L T A T S -

- Ière PARTIE -

VARIATION DE LA COMPOSITION
DE LA CASEINE K

1 - Composition comparée de la caséine K de deux
troupeaux de race différente

1.1 - Objet de la comparaison

Dans cette étude, nous avons comparé deux troupeaux homogènes de 60 vaches laitières, de race différente. Les vaches de race Pie Rouge de l'Est étaient élevées dans la région de Mirecourt (Vosges) alors que celles de race Française Frisonne Pie Noire vivaient sur une exploitation agricole de la région de Nancy.

Nous avons effectué le phénotypage d'un échantillon important de chaque troupeau étudié afin de voir s'il existait une différence dans la fréquence des allèles. Le tableau 2 résume les résultats de ce phénotypage et montre que la fréquence des allèles est la même dans les deux cas.

Nous avons déterminé la composition du caséino-glycopeptide qui contient tous les glucides de la caséine K et qui est probablement la partie la plus variable de cette caséine en ce qui concerne les acides aminés. C'est dans cette moitié de la molécule de caséine K que se produisent les substitutions génétiques. Nous avons ainsi séparé la caséine entière pour chaque troupeau à 5 époques différentes de l'année et préparé et analysé leur caséino-glycopeptide.

1.2 - Partie peptidique

La figure 4 présente les variations du nombre de résidus des 12 acides aminés qui constituent le caséino-

Tableau 2 - Distribution des variants génétiques de la caséine K dans les troupeaux étudiés.

	Pie Noire	Pie Rouge
- Nombre d'échantillons	40	55
- Distribution des variants génétiques		
A A	12	20
A B	25	28
B B	3	7
- Fréquence des allèles		
A	0.61	0.62
B	0.39	0.38

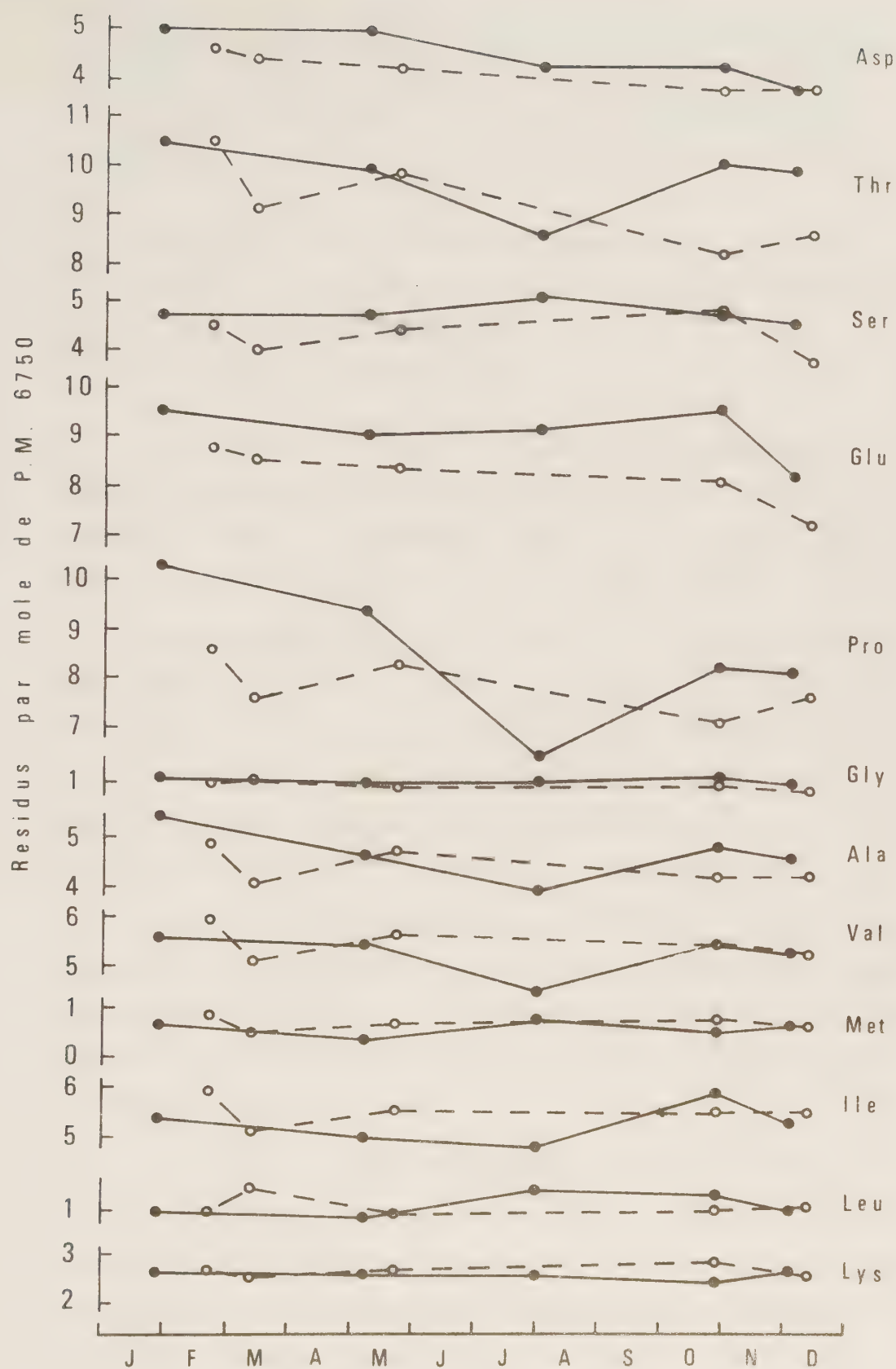


Figure 4 - Evolution de la composition en acides aminés du caséinoglycopeptide en fonction de l'époque de l'année.

● — ● F.F.P.N.

○ — ○ P.R.E.

glycopeptide. On remarque que l'évolution des courbes n'est pas identique dans tous les cas et que, pour un même acide aminé, il y a des écarts entre les deux troupeaux.

A partir de ces données, nous avons fait une interprétation statistique des variations de la composition du caséino-glycopeptide.

1.2.1 - "Effet date"

Le tableau 3 résume la composition moyenne en acides aminés des caséino-glycopeptides de vaches Pie Rouge de l'Est et de vaches Française Frisonne Pie Noire et la variabilité de cette composition.

On constate chez les vaches Pie Rouge une variation pour la glycine, l'alanine et la leucine et chez les vaches Pie Noire une variation pour l'acide aspartique, la proline, l'alanine et la leucine. On remarque que dans les deux troupeaux de races différentes, il y a une variation commune pour l'alanine et la leucine.

La matrice de corrélation (tableau 4) entre les différents acides aminés montre que, après avoir éliminé le facteur erreur due à l'analyse, il y a une corrélation positive dans les deux troupeaux entre l'alanine, la thréonine et la proline.

1.2.2 - "Effet troupeau"

La dernière colonne du tableau 3 montre les différences entre les deux troupeaux, en ce qui concerne la composition moyenne en acides aminés du caséino-glycopeptide.

On remarque que seule la teneur en acide glutamique présente une différence significative suivant la race. Il semble donc que la race n'influe que très peu sur la composition en acides aminés de cette partie de la caséine K.

de vaches Française Frisonne Pie Noire et Pie Rouge de l'Est.
(exprimée en résidus par mole de 6750 daltons) (59)

	F.F.P.N.				P.R.E.				Différence		Caséino-glyco-peptide d'après la structure(59)
	$\bar{x}$	σ	F	S (a)	$\bar{x}$	σ	F	S	F	S (a)	
Asp	4.5	0.30	6.57	*	4.2	0.31	2.15		1.40		4
Thr	10.0	1.56	0.44		9.2	1.18	1.34		2.16		11
Ser	4.8	0.74	0.14		4.3	0.59	1.46		4.84		6
Glu	9.1	0.78	1.33		8.2	0.54	3.15		6.21	*	10
Pro	8.6	1.01	4.87	*	7.8	1.19	0.49		1.28		8
Gly	1.1	0.10	2.36		1.0	0.06	6.10		4.32	*	1
Ala	4.8	0.24	11.59	***	4.4	0.22	6.68		1.48	*	6
Val	5.3	0.63	1.14		5.5	0.47	1.28		0.37		6
Met	0.6	0.19	1.41		0.7	0.22	1.03		0.61		1
Ile	5.3	0.34	3.18		5.4	0.36	2.85		0.11		7
Leu	1.1	0.11	9.66	***	1.1	0.07	18.56		0.02	***	1
Lys	2.6	0.14	0.87		2.7	0.16	1.87		0.55		3

(a) signification des différences ou variations

* significatif à 5%
*** significatif à 1%

1.3 - Partie non peptidique

Les variations de composition dans le temps sont représentées dans la figure 5. La teneur en phosphore du caséino-glycopeptide est restée stable de Novembre à Mars, ensuite elle augmente ; les courbes sont presque identiques pour les deux races. Par contre, en ce qui concerne les glucides, il y a moins de concordance.

Le tableau 5 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les caséino-glycopeptides provenant de vaches de race Pie Rouge et de race Pie Noire et donne donc la composition moyenne du caséino-glycopeptide.

Le tableau 6 donne les matrices de corrélation entre les différents constituants non peptidiques du caséino-glycopeptide ; il n'y a de corrélation qu'entre les osamines et l'acide sialique et dans la race Pie Noire seulement.

Dans le tableau 7, on a regroupé des valeurs caractéristiques concernant les glucides du caséino-glycopeptide. On voit que la variabilité de la partie non peptidique est plus grande, au cours du temps, dans le cas de la race Pie Noire que dans le cas de la race Pie Rouge, qu'il s'agisse des rapports moléculaires ou du total non peptidique, donc du poids moléculaire. Les rapports molaires sont proches de 1 dans le caséino-glycopeptide de la race Pie Rouge ; dans celui de la race Pie Noire, on observe une proportion plus élevée des oses neutres, presque double dans trois prélèvements sur cinq.

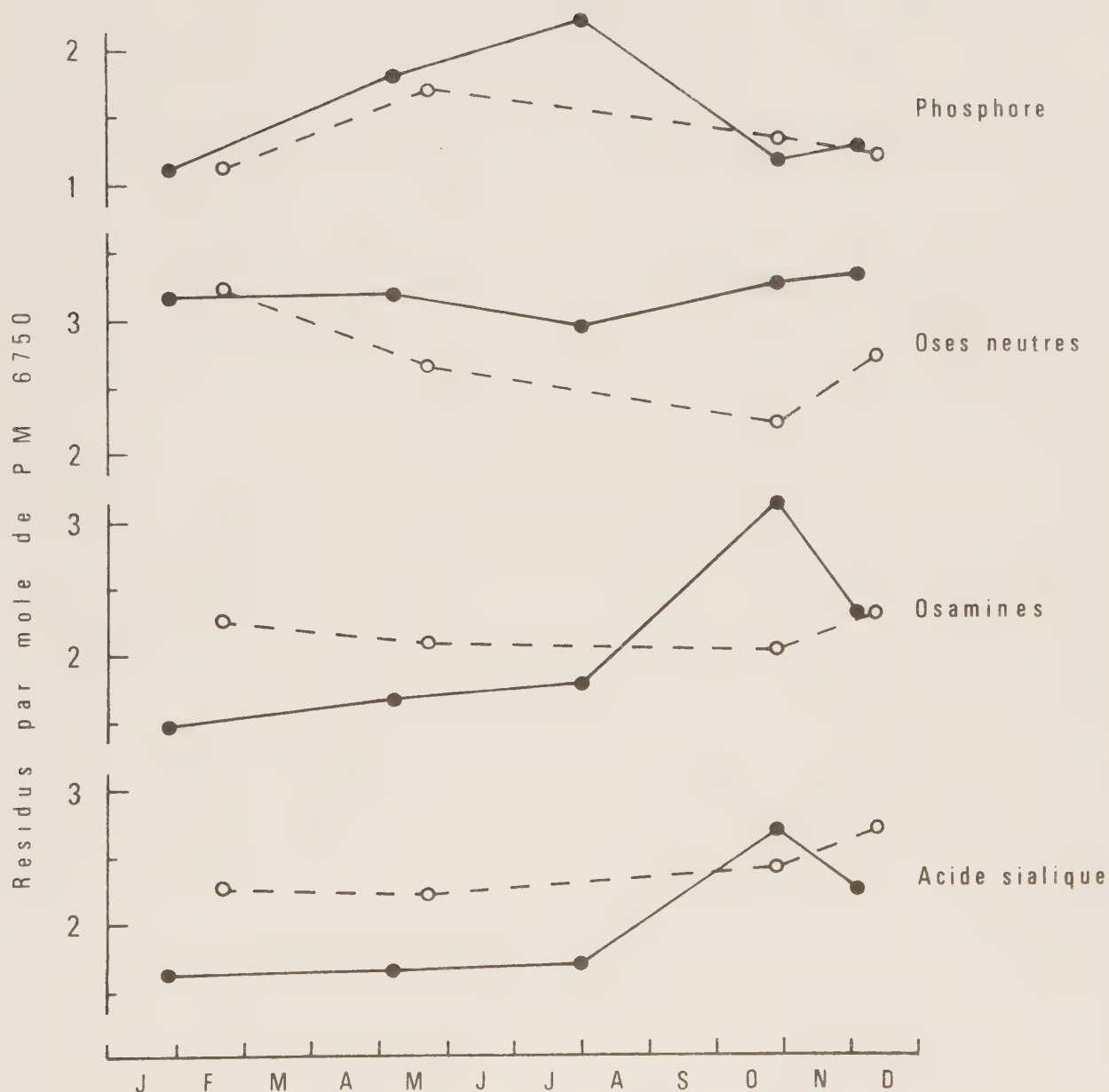


Figure 5 - Variations de la composition de la fraction non peptidique du caséinoglycopeptide en fonction de l'époque de l'année.

● — ● F.F.P.N.

○ — ○ P.R.E.

Tableau 5 - Composition moyenne de la partie non peptidique
du caséino-glycopeptide suivant la race (en %)

Caséino- glycopeptide	Phosphore		Osés neutres		Osamines		Ac. sialiques	
	$\bar{x}$	σ	n					
P.F.P.N.		0.59		7.00		4.56		7.42
		0.166		0.205		1.200		1.439
			5		5			5
P.R.E.	$\bar{x}$	0.52		5.96		4.77		9.01
	σ	0.077		0.747		0.210		0.690
	n		4		4			4
	t	0.382		1.494		0.153		0.913
signification		N.S.		N.S.		N.S.		N.S.
moyenne générale	$\bar{x}$	0.55		6.54		4.65		8.12
	σ	0.419		0.513		0.918		1.177

Tableau 6 - Matrice de corrélation entre les différents constituants
de la partie non peptidique de caséino-glycopeptides
venant de vaches de races différentes

	Phosphore	Osés neutres	Osamines
1 - <u>F.F.P.N.</u>			
- Osés neutres	- 0.750 (N.S)		
- Osamines	- 0.393 (N.S)	0.142 (N.S)	
- Acide sialique	- 0.507 (N.S)	0.282 (N.S)	0.961 (1%)
2 - <u>P.R.E.</u>			
- Osés neutres	- 0.222 (N.S)		
- Osamines	- 0.724 (N.S)	0.706 (N.S)	
- Acide sialique	- 0.303 (N.S)	-0.385 (N.S)	0.381 (N.S)

Tableau 7 - Caractéristiques moléculaires de la partie non peptidique
des caséino-glycopeptides.

Date de prélèvement	Rapports molaires			total non peptidique p. 100	P.M. du caséinogly- copeptide (*)
	Oses neutres	Osamines	Acide sialique		
1 - <u>F.F.P.N.</u>					
28.X.68	1.2	1.2	1	26.2	8516
3.XII.68	1.5	1.0	1	23.1	8311
27. I .69	2.0	0.9	1	18.5	7996
6. V. 69	1.9	1	1	19.8	8090
31.VII.70	1.8	1.1	1	20.2	8114
2 - <u>P.R.E.</u>					
11.XII.68	1.0	0.8	1	23.4	8331
22. V .69	1.2	0.9	1	21.6	8210
28. X. 69	0.9	0.8	1	21.1	8171
20.II. 70	1.4	1.0	1	22.6	8275

* Calculé pour un P.M. de la partie peptidique de 6750 daltons (59)

2 - Variation de la composition de la caséine K de deux vaches homozygotes pour les loci K-Cn^A et K-Cn^B.

2.1 - Objet de l'étude

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes servis du phénotypage dont les résultats sont rassemblés dans le tableau 2. Nous avons pris au hasard dans le troupeau de vaches de race Pie Noire une vache homozygote pour le locus K-Cn^A et une autre homozygote pour le locus K - Cn^B.

Dans cette partie de notre travail, nous avons séparé la caséine entière de laits obtenus à différentes époques de l'année, 5 pour la vache de type caséine K_A et 4 pour la vache de type caséine K_B. A partir de la caséine entière, on a préparé chaque fois la caséine K pure.

2.2 - Partie peptidique

La figure 6 présente les variations du nombre de résidus des acides aminés que nous avons dosé dans la caséine K. On remarque que les courbes ne présentent pas d'allure générale de variation et que l'évolution de la composition en chaque acide aminé est différente selon le type de caséine K.

De ces données nous avons effectué une interprétation statistique des variations de la composition des caséines K.

2.2.1 - "Effet date"

Le tableau 8 donne la composition moyenne en acides aminés des caséines K_A et K_B et la variabilité de cette composition.

La caséine K_A montre des variations importantes

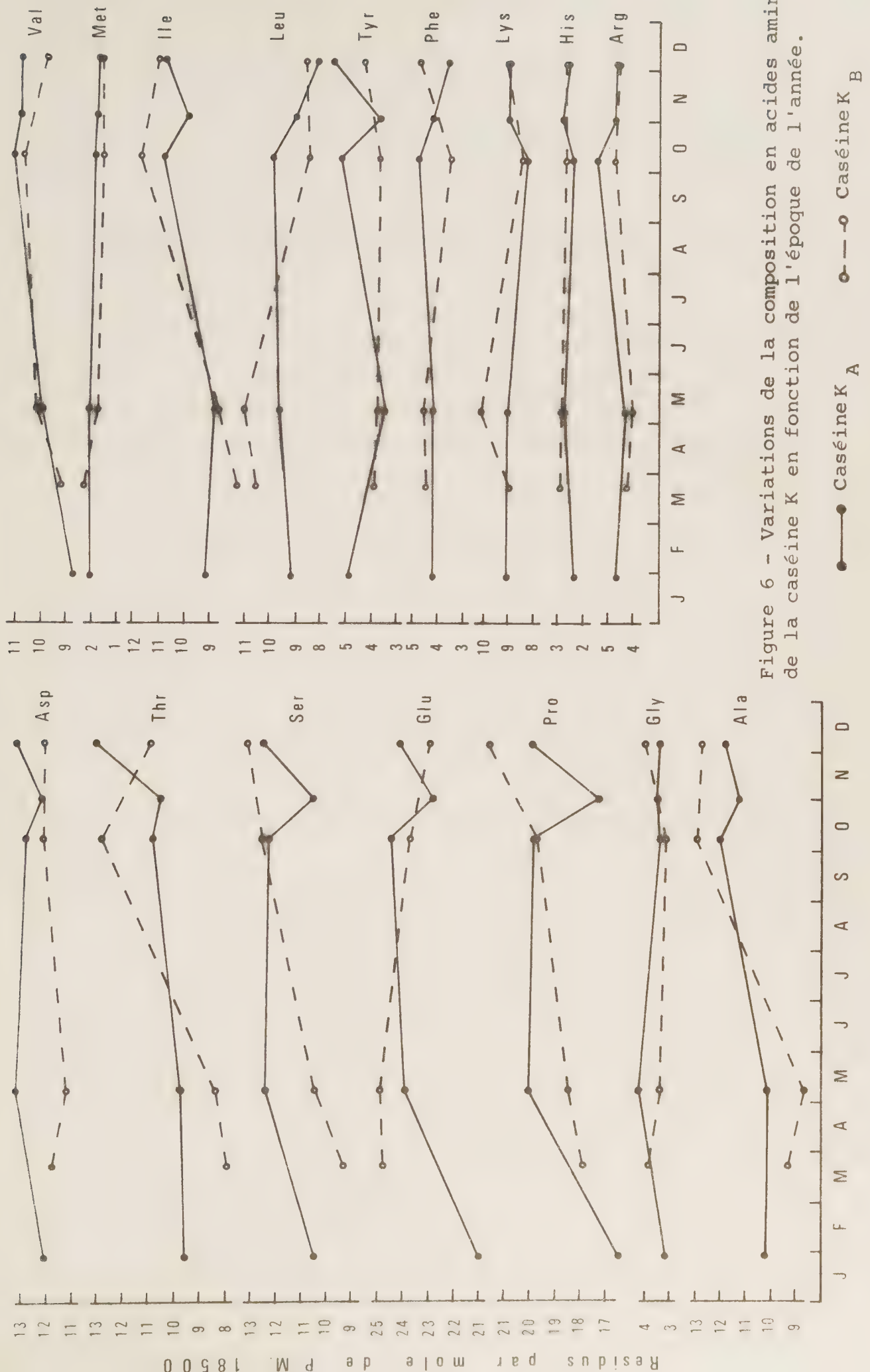


Figure 6 - Variations de la composition en acides aminés de la caséine K en fonction de l'époque de l'année.

Tableau 8 - Composition moyenne en acides aminés des caséines K_A et K_B

	Caséine K _A				Caséine K _B				Différence		Composit.d'après la structure (61)	
	$\bar{x}$	σ	F	S (a)	$\bar{x}$	σ	F	S (a)	F	S (a)	K _A	K _B
Asp	12.8	0.75	1.07		11.9	0.61	1.14		6.40	*	11	10
Thr	10.8	0.81	6.47	*	11.1	0.58	32.58	***	0.33		14	13
Ser	11.8	0.72	4.38		11.5	0.97	7.07	*	0.08		13	13
Glu	23.4	0.64	10.30	*	24.1	0.83	2.26		0.93		27	27
Pro	18.8	0.99	6.06	*	19.5	0.98	5.87		0.40		20	20
Gly	3.6	0.17	11.92	*	3.7	0.22	6.49		0.04		2	2
Ala	11.1	0.21	38.54	***	11.0	0.24	18.07	***	0.03		15	16
Val	10.3	0.29	21.35	***	10.0	0.69	1.49		0.37		11	11
Met	1.9	0.15	2.61		1.9	0.33	1.97		0.02		2	2
Ile	9.9	0.29	18.43	***	9.8	0.42	37.59	***	0.003		13	14
Leu	9.2	0.48	3.96		9.7	0.30	40.15	***	0.55		8	8
Tyr	4.6	0.18	55.37	***	4.0	0.53	0.53		1.83		9	9
Phe	4.3	0.29	4.40		4.4	0.48	2.41		0.06		4	4
Lys	8.9	0.43	1.08		9.2	0.48	3.95		0.67		9	9
His	2.7	0.12	7.23	*	2.8	0.19	1.15		1.41		3	3
Arg	4.8	0.16	11.09	*	4.5	0.24	3.30		2.14		5	5

(a) signification des différences ou variations
* significatif à 5% *** significatif à 1%

puisque 10 acides aminés sur les 16 dosés présentent des différences significatives à 5% ou à 1% en fonction du temps. La caséine K_B montre des variations moins importantes ; en effet 5 acides aminés seulement présentent des différences significatives.

Il est à remarquer que 3 acides aminés seulement, la thréonine, l'alanine et l'isoleucine présentent simultanément des variations dans les caséines K_A et K_B .

La matrice de corrélation (tableau 9) entre les acides aminés pour les caséines K_A et K_B ne montre pas de point commun entre les deux caséines. On peut même remarquer entre la proline et l'acide glutamique des corrélations de signe différent.

2.2.2 - "Effet variant génétique"

La troisième colonne du tableau 8 montre une différence significative entre les caséines K_A et K_B seulement pour l'acide aspartique. Cette différence ne confirme que très partiellement les substitutions mises en évidence entre les variants génétiques par HILL et al. (60).

Nous tenterons d'expliquer ces résultats dans la discussion.

2.3 - Partie non peptidique

La figure 7 représente les variations des compositions des caséines K_A et K_B en fonction de la date. On remarque une teneur en phosphore plus élevée pendant le printemps que pendant le reste de l'année. Par contre les teneurs en glucides varient peu au cours de l'année (sauf pour 2 prélèvements) ; il ne se dessine pas de tendance générale de variation.

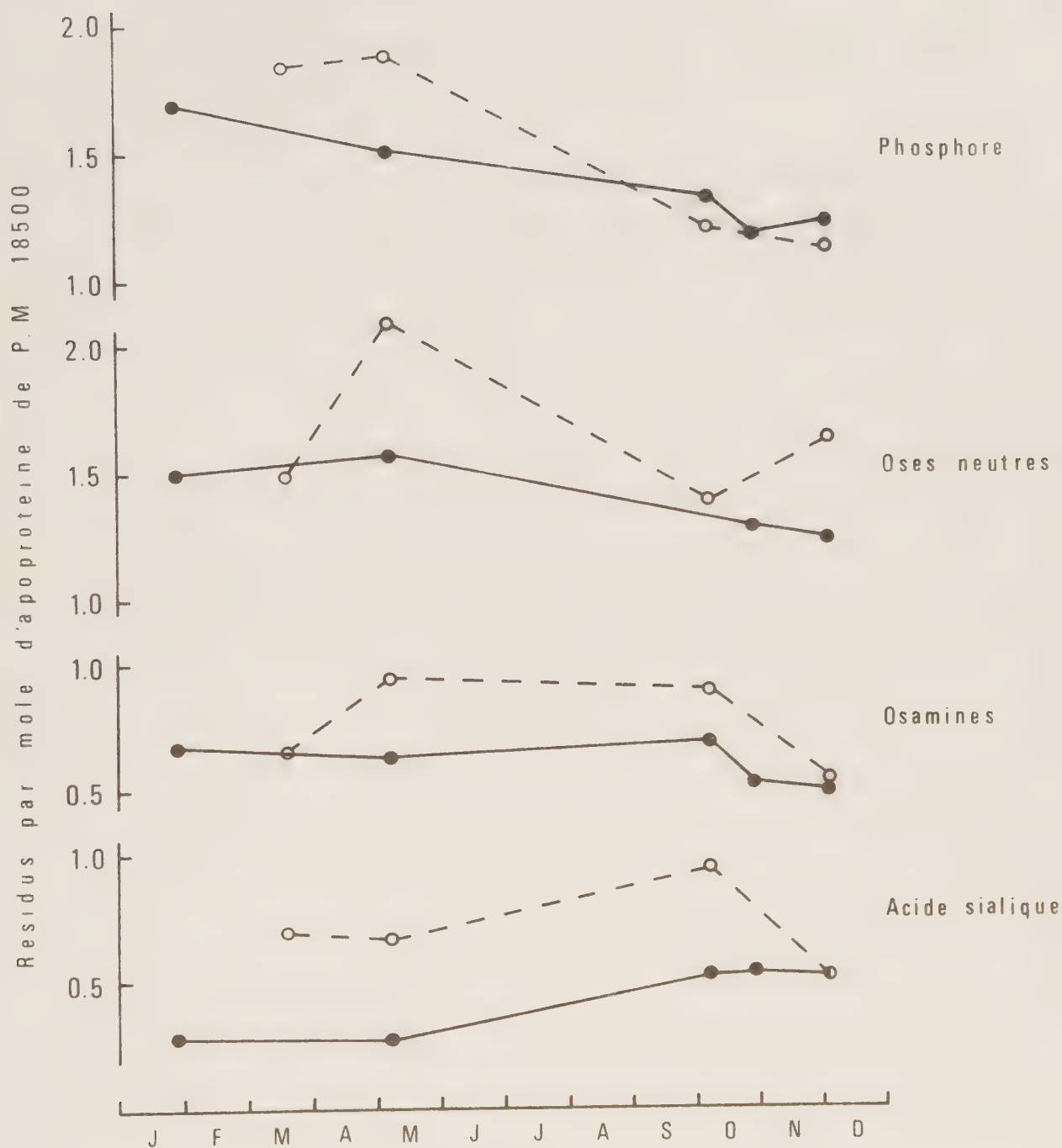


Figure 7 - Variations de la composition de la fraction non peptidique de la caséine K

● — ● Caséine K_A ○ — ○ Caséine K_B

Les résultats présentés dans le tableau 10 ne révèlent pas de différence significative entre les caséines K_A et K_B en ce qui concerne les constituants non peptidiques. On peut donc calculer une teneur moyenne qui est indiquée au bas du tableau.

Les matrices de corrélation représentées dans le tableau 11 montrent seulement pour la caséine K_A des corrélations entre le phosphore, les oses neutres et l'acide sialique. Aucune corrélation n'apparaît dans le cas de la caséine K_B.

Le tableau 12 regroupe les valeurs caractéristiques concernant les glucides de la caséine K. Les rapports moléculaires sont plus éloignés que dans le cas des caséino-glycopeptides des troupeaux : ce sont surtout ceux des oses neutres qui s'écartent le plus de l'unité.

Tableau 10 - Composition moyenne de la partie non peptidique
des caséines K_A et K_B (en %)

	Phosphore			Osés neutres	Osamines	Ac sialique
	$\bar{x}$	σ	n			
Caséine K A	0.22	0.029	5	1.29 0.122 4	0.56 0.070 5	0.69 0.185 5
Caséine K B	0.24	0.055	4	1.50 0.258 4	0.70 0.155 4	1.12 0.235 4
	t	0.306		0.718	0.903	1.476
Signification	N.S.			N.S.	N.S.	N.S.
Moyenne générale	$\bar{x}$	0.23		1.40	0.62	0.88
	σ	0.042		0.202	0.155	0.208

Tableau 11 - Matrice de corrélation entre les différents constituants
de la partie non peptidique des caséines K_A et K_B .

	Phosphore	Oses neutres	Osamines
1 - <u>Caséine K_A</u>			
- Oses neutres	+ 0.949 (2%)		
- Osamines	+ 0.662 (N.S)	+ 0.766 (N.S)	
- Ac. sialique	- 0.916 (5%)	- 0.940 (5%)	- 0.410 (N.S.)
2 - <u>Caséine K_B</u>			
- Oses neutres	+ 0.545 (N.S)		
- Osamines	+ 0.313 (N.S)	+ 0.284 (N.S)	
- Ac. sialique	- 0.133 (N.S)	- 0.546 (N.S)	+ 0.648 (N.S.)

Tableau 12 - Caractéristiques moléculaires de la partie non peptidique
des caséines K.

Date de Prélèvement	Rapports molaire			total non peptidique p. 100	P.M. de la caséine K (*)
	Oses neutres	Osamines	Acide sialique		
1 - <u>Caséine K_A</u>					
- 28. X. 68	2.4	1.0	1	3.27	19085
- 3.XII.68	2.4	1.0	1	3.20	19018
- 27. I. 69	5.0	2.3	1	3.61	19110
- 6. V. 69	5.5	2.1	1	3.51	19083
- 7. X. 69	/	1.3	1	3.13	19053
2 - <u>Caséine K_B</u>					
- 3.XII.68	3.1	1.0	1	3.32	19062
- 6. V. 69	3.1	1.4	1	4.66	19316
- 7. X. 69	1.4	0.9	1	4.10	19210
- 19.III.70	2.1	0.9	1	3.74	19141

(*) calculé pour un P.M. de la partie peptidique de 18500 daltons (61)

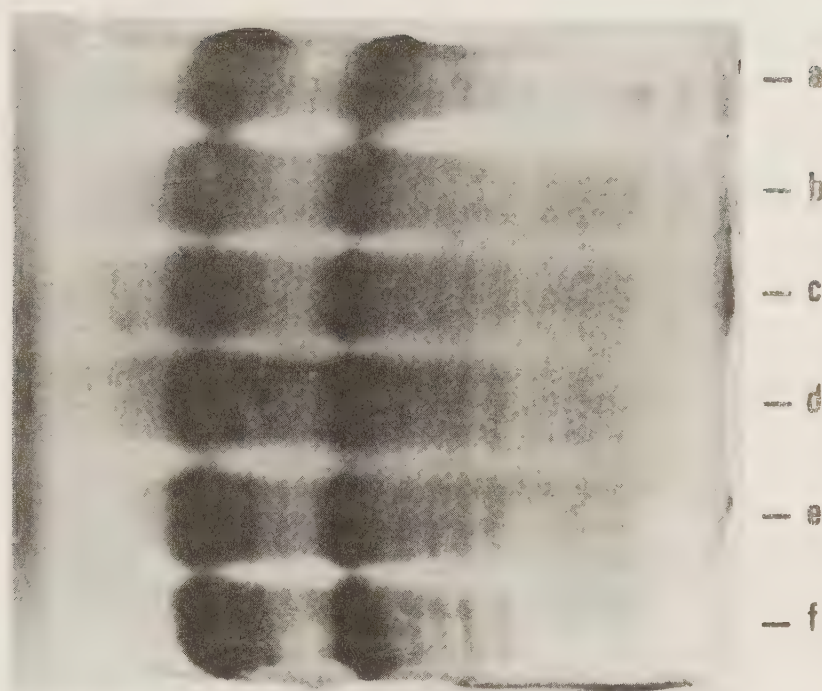


Figure 8 - Electrophorèse de la caséine entière de colostrum 0h 15 (a), 6 h (b), 18 h (c), 30 h (d), 42 h (e) et 60 heures après vêlage.

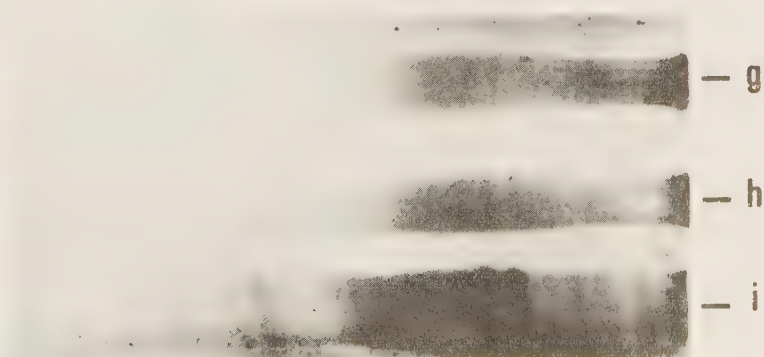


Figure 9 - Electrophorèse de la caséine K de colostrum (g-h) et de lait normal (i).

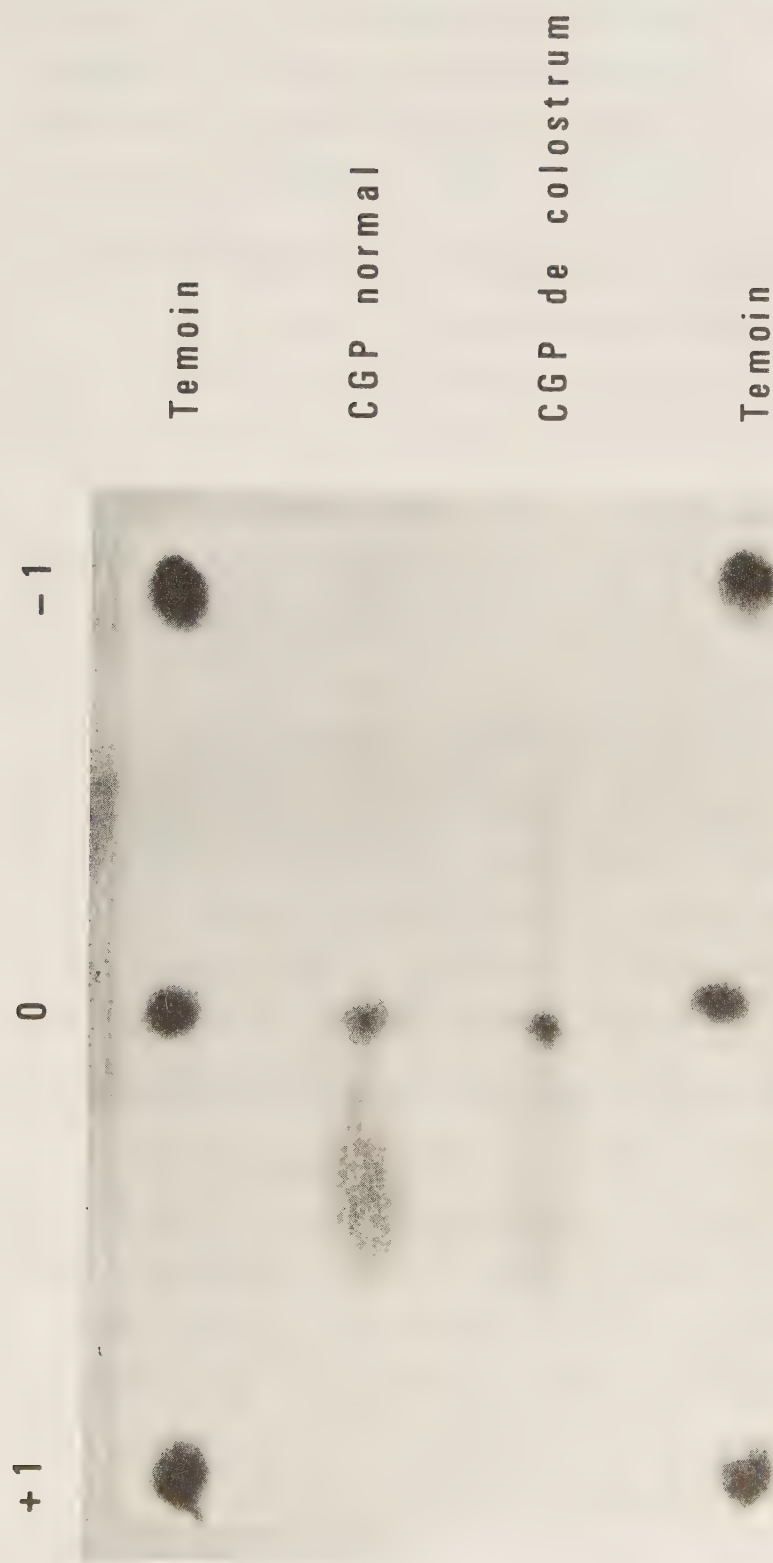


Figure 10 - Electrophorèse sous haute tension
du caséinoglycopeptide de colostrum.

présente vers l'anode une tache plus allongée comportant au moins deux substances différentes ; il présente également la tache au point de charge 0 ; de plus on peut discerner plusieurs petites taches se touchant les unes les autres et migrant vers la cathode.

2 - Composition de la caséine K de colostrum

Le tableau 13 présente la composition moyenne de deux caséines K de colostrum provenant de la première traite de deux vaches différentes, les valeurs étant concordantes.

La composition de la partie peptidique de la caséine K de colostrum s'approche de celle de la caséine K normale, mais on note des différences marquées notamment pour la glycine, la proline la tyrosine et la phenylalanine.

La fraction glucidique est beaucoup plus importante dans la caséine K de colostrum que dans la caséine K normale; les rapports molaires ne sont pas les mêmes dans les deux cas pour les trois constituants : oses neutres, osamines et acide sialique. Par contre la phosphorylation de la caséine K de colostrum semble normale.

3 - Action de la chymosine sur la caséine de colostrum

La figure 11 montre l'évolution de la quantité de NPN libéré (a) parallèlement à la proportion de NPN soluble dans l'acide trichloracétique ou NPN-O (b) et à la teneur en azote total de la caséine (c). Les courbes représentent la moyenne de 4 séries d'échantillons différents, les résultats étant concordants.

En ce qui concerne le comportement de la caséine vis à vis de la chymosine, on peut diviser la période post-partum en deux parties ; de 0 à 30 heures, la proportion de NPN libéré est élevée (autour de 2%) et, après 42 heures, elle évolue autour de 1% ; cette teneur est la proportion

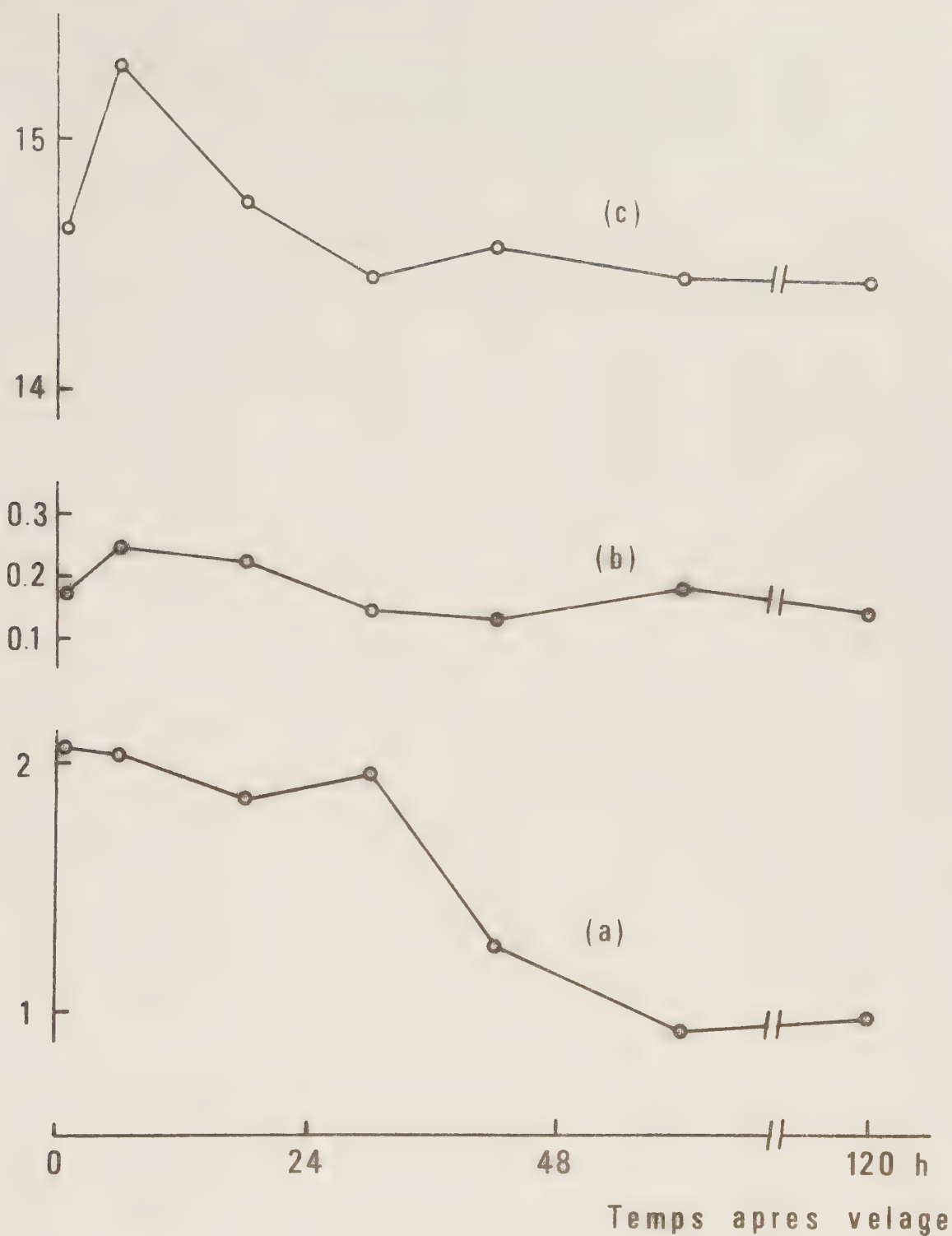


Figure 11 - Evolution de la teneur en azote total de la caséine entière de colostrum et de l'azote non protéique (NPN) libéré par la chymosine de cette caséine.

a - NPN libéré par la chymosine, en % d'azote total

b - NPN - O soluble dans 12% de TAC, en % d'azote total

c - Azote total, en % de la caséine

Tableau 13 - Composition de la caséine K de colostrum (en résidus par mole d'apoprotéine de 18500 daltons)

	Colostrum (1)	lait normal (2,3)
Asp	11.9	11
Thr	10.2	14
Ser	12.1	13
Glu	20.9	27
Pro	10.7	20
Gly	6.7	2
Ala	11.2	15
Val	9.2	11
Cys	2.9	2
Met	1.7	2
Ile	8.0	13
Leu	10.3	8
Tyr	6.2	9
Phe	5.6	4
Lys	9.2	9
His	2.6	3
Arg	5.6	5
Phosphore	1.18	1.46
Osés neutres	3.12	1.52
Osamines (4)	1.77	0.69
Ac.sialique (5)	0.87	0.57

- 1 - Valeur moyenne de 2 échantillons de caséines différentes.
- 2 - D'après MERCIER et al. (61) pour les acides aminés.
- 3 - Valeur moyenne de 18 analyses de 9 échantillons de caséines différentes pour les glucides.
- 4 - Exprimés en N -acétylglucosamine.
- 5 - Exprimés en acide N -acétylneuraminique.

habituellement obtenue, dans les mêmes conditions analytiques, avec la caséine du lait normal. La solubilité de la caséine du colostrum dans 12% de TCA (NPN - O) ne varie pratiquement pas ; elle est comparable à celle de la caséine du lait.

La teneur en azote de la caséine du colostrum s'élève curieusement à la sixième heure ; dans les autres prélèvements, elle varie peu, autour de 14,6.

L'exploitation statistique des résultats (tableau 14) montre que l'écart entre les valeurs de NPN libéré par la chymosine dans les deux parties de la période post-partum est significatif à 1%. Par contre, la teneur en azote et la proportion de NPN - O sont assez uniformes.

Ces données traduisent une teneur importante de la caséine entière de colostrum en caséine K ; nous l'avons estimée à 24% d'après la libération de NPN par la chymosine. Nous avons pris comme base de calcul le fait que la chymosine libère 8,3% d'azote non protéique de la caséine K normale (62). RIBADEAU-DUMAS et VEAUX (27) ont indiqué une teneur encore plus élevée, 35% alors qu'on l'estime à 15% dans la caséine entière du lait normal. En fait cette estimation est difficile et, selon les méthodes utilisées, les chiffres peuvent varier de 10,6 - 12,3% (63) à 19% (62).

4 - Composition du caséinoglycopeptide de colostrum

4.1 - Partie peptidique _

La figure 12 présente l'évolution de la composition en acides aminés des caséinoglycopeptides de colostrum provenant de deux vaches et prélevés pendant les 65 heures qui suivent la parturition. On constate que les teneurs en acides aminés varient peu et que, comme dans le caséinoglycopeptide de lait normal, les acides aminés aromatiques, la cystéine et l'arginine font défaut (64).

Le tableau 15 donne la teneur moyenne et l'écart-type

Tableau 14 - Azote non protéique libéré par la chymosine de la caséine entière de colostrum (Moyenne de 4 vaches différentes)

	0- 36 heures après vélage	36-120 heures après vélage	Signification (*)
Azote total % caséine	14.8 $\sigma = 0.686$	14.5 $\sigma = 0.389$	t = 1.09 N.S.
NPN - O % N caséine	0.20 $\sigma = 0.091$	0.15 $\sigma = 0.064$	t = 1.36 N.S.
Δ NPN % N caséine	1.98 $\sigma = 0.638$	1.06 $\sigma = 0.425$	t = 3.62 S à 1%

(*) Test t de Student

N.S. = Différence non significative

S. = Différence significative et degré de signification

σ = Ecart - type.

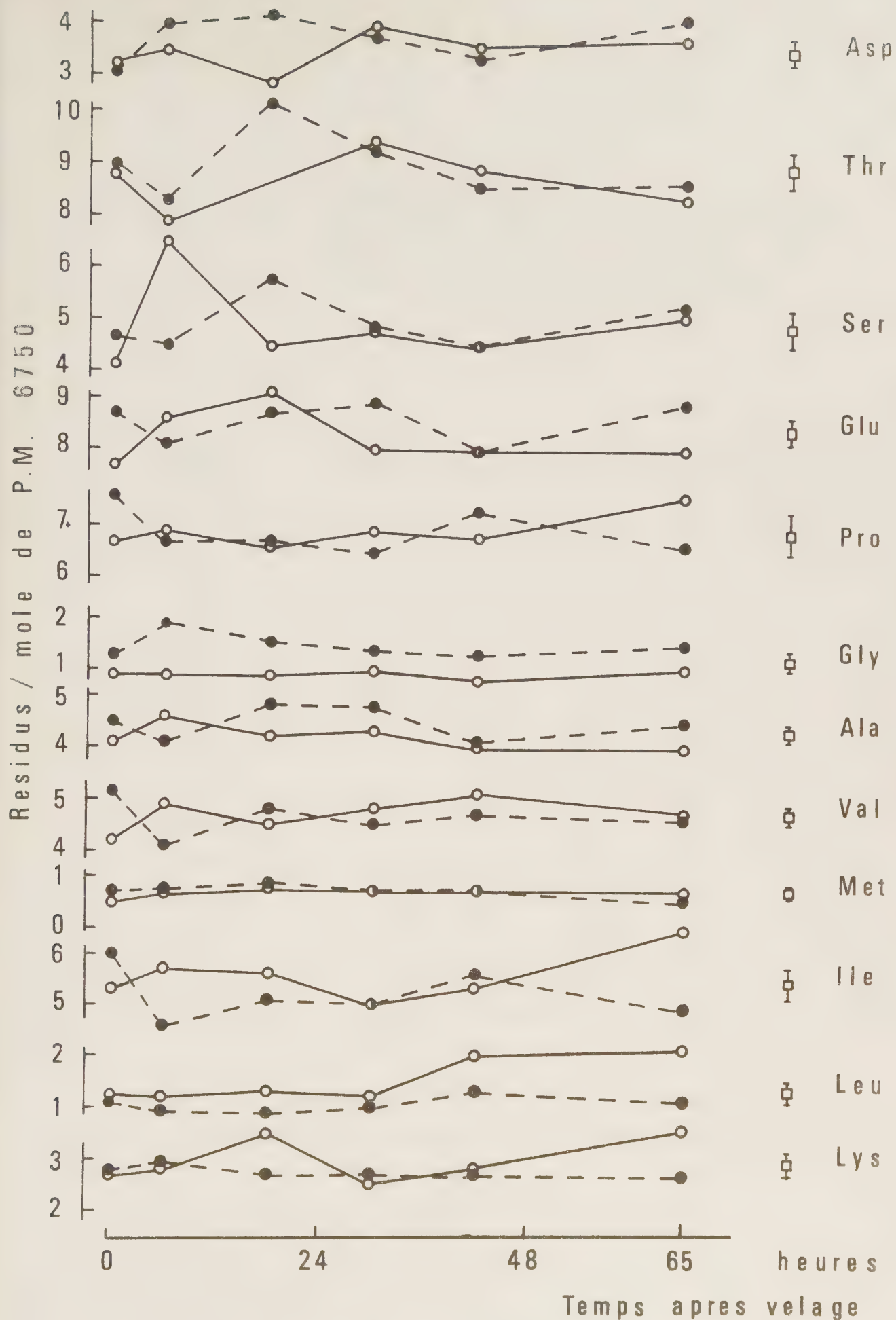


Figure 12 - Evolution de la composition en acides aminés du caséinoglycopeptide de colostrum.

- Tableau 15 - Composition moyenne en acides aminés du caséinoglycopeptide de colostrum (en résidus par mole de 6750 daltons).

Acides Aminés	caséino-glycopeptide de colostrum (*)	Ecart-type	caséino-glycopeptide de lait normal (59)
Asp	3.6	0.44	4
Thr	9.0	0.63	11
Ser	4.9	0.66	6
Glu	8.4	0.47	10
Pro	6.9	0.72	8
Gly	1.2	0.34	1
Ala	4.3	0.30	6
Val	4.7	0.32	6
Met	0.7	0.10	1
Ile	5.4	0.52	7
Leu	1.3	0.38	1
Lys	2.9	0.47	3

(*) Valeur moyenne de 12 échantillons de caséino-glycopeptides provenant de 2 vaches différentes.

pour chaque acide aminé de caséinoglycopeptide de colostrum : par comparaison on a indiqué la composition du caséino-glycopeptide normal déduite de la structure (59).

4.2 - Partie non peptidique

4.2.1 - Variation de sa composition

La figure 13 présente l'évolution des différents constituants non peptidiques du caséinoglycopeptide de colostrum.

La teneur en phosphore varie un peu pendant les 24 heures qui suivent la parturition, puis redevient normale. Les teneurs en oses neutres et en acide sialique passent par un maximum 6 heures après la parturition puis diminuent pour devenir normales 66 heures après vélage.

La teneur en osamines, élevée à la parturition, diminue pour devenir normale 66 heures après la parturition.

4.2.2 - Identification des osamines

L'étude par chromatographie sur résine Dowex-50 de la nature des hexosamines présents dans le caséino-glycopeptide de colostrum nous a montré la présence de glucosamine en plus de la galactosamine qui se trouve seule dans le caséinoglycopeptide normal (45).

Le tableau 16 montre l'évolution de la teneur en glucosamine et galactosamine du caséinoglycopeptide de colostrum. La teneur en glucosamine est la même au moment du vélage et après 18 heures ; la teneur en galactosamine s'abaisse progressivement.

Les osamines présents dans le caséinoglycopeptide de colostrum sont N - acétylés, comme dans le caséino-glycopeptide normal (65).

4.2.3 - Relation entre l'azote libéré par la chymosine et la teneur en acide sialique de la caséine entière

Le dosage de l'azote libéré par la chymosine et de

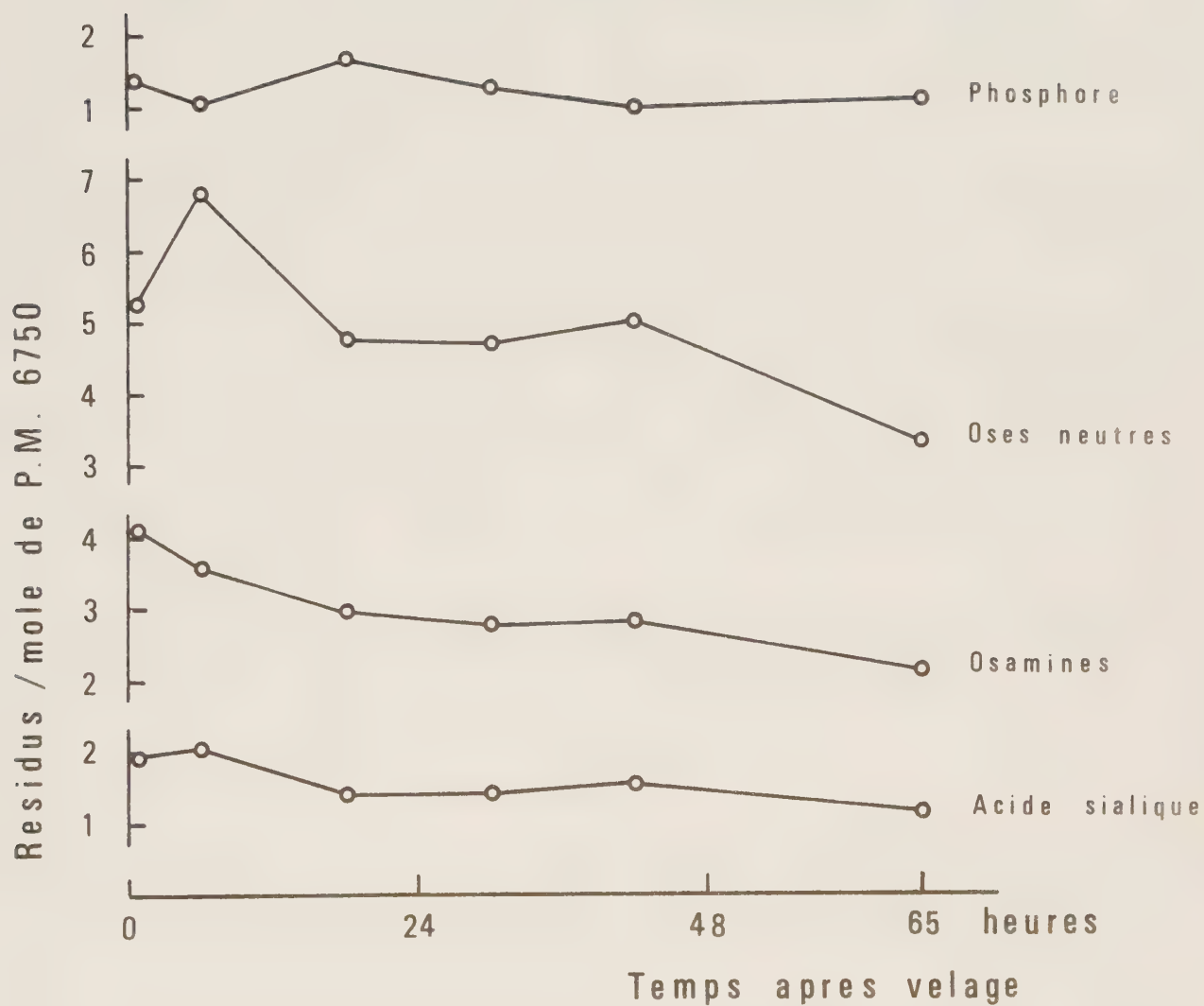


Figure 13 - Composition de la fraction non peptidique du caséinoglycopeptide de colostrum.

Tableau 16 - Composition en osamines du caséinoglycopeptide de colostrum (en %) déterminée après hydrolyse acide.

	Galactosamine	Glucosamine	Rapport Galactosamine: Glucosamine
0h.15 après vélage	7.22	1.87	1/0.26
18h. après vélage	5.61	1.83	1/0.33
pleine lactation(*)	4.65	0	-

(*) Moyenne de 9 échantillons.

Tableau 17 - Acides aminés libérés du caséinoglycopeptide de colostrum par la carboxypeptidase A (en résidus par mole).

	Caséinoglycopeptide de colostrum		caséinoglycopeptide normal (64)
	n° 1	n° 2	
Thr	0.62	0.79	0.41
Ser	0.26	0.35	0.13
Ala	0.82	0.79	0.70
Val	1.0	1.0	1.0

l'acide sialique sur des caséines entières de colostrum nous a montré que, dans des séries de colostrum provenant de trois vaches différentes, il existe une corrélation positive significative à 1% ($r = + 0.649$ pour $n = 20$) entre ces deux éléments. Cette corrélation avait été mise en évidence dans la caséine entière par MARIER et al. (66)

4.3 - Détermination des acides aminés C-terminaux

Les acides aminés libérés par la carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1.) se retrouvent dans les mêmes proportions quand on utilise comme substrat un caséinoglycopeptide de colostrum ou un caséinoglycopeptide normal (64) (tableau 17). La séquence C- terminale de la caséine K semble donc être la même dans les deux cas.

- DISCUSSION -

Dans un premier temps nous passerons en revue les différentes causes de variation de la composition des protéines en général, et ensuite nous essaierons de préciser quels sont les facteurs qui peuvent être responsables des variations que nous avons remarquées.

1 - Causes d'hétérogénéité et de variation de composition des protéines

L'hétérogénéité des protéines peut avoir trois origines différentes :

- pendant la biosynthèse
- Après la biosynthèse, mais dans le milieu naturel de la protéine
- Au cours des préparations et traitements que subit la protéine pendant les différentes manipulations effectuées au laboratoire.

1.1 - Evolution pendant la biosynthèse

Pendant la biosynthèse de la partie peptidique, la protéine peut, si l'animal est hétérozygote pour le gène concerné, être synthétisée sous deux formes alléliques différentes. Ces "allélomorphes" peuvent être dus soit à la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés soit à la déletion d'un acide aminé ou d'un fragment plus ou moins important de la chaîne peptidique. HILL et al. (60) ont montré que les allélomorphes de la caséine K différaient l'un de l'autre par la substitution de l'acide aspartique par l'alanine et de la thréonine par l'isoleucine dans la caséine K_B. Ces modifications sont liées au potentiel génétique de l'animal et ne peuvent changer pour un même animal que lors de mutations.

Lorsque la biosynthèse de la chaîne peptidique est achevée, la molécule est complétée par l'adjonction

d'un certain nombre de groupements phosphates pour les phosphoprotéines et de un ou plusieurs résidus glucidiques fixés en un ou plusieurs points de la molécule pour les glycoprotéines. TURKINGTON et TOPPER (67) ont montré que, chez la souris, la phosphorylation de la caséine a effectivement lieu après que la biosynthèse de la chaîne peptidique soit achevée. La phosphorylation touche les résidus de sérine ou de thréonine, et il semble qu'il existe un site privilégié de fixation du phosphore sur la caséine : en général, on retrouve à $n + 2$ (n correspondant au site phosphorylé) un acide aminé acide, dont la charge négative est fournie soit par l'acide glutamique, soit par le résidu phosphorique d'une phosphosérine. Cette observation de MERCIER et al. (68) n'est pas générale, et il en existe des exceptions, en particulier dans la caséine K (59). Les travaux de GROVES et GORDON (69) suggèrent la présence dans la caséine humaine d'une protéine unique qui posséderait de 0 à 5 atomes de phosphore par molécule.

Les protéines sont souvent le support de chaînes glycaniques plus ou moins longues, ramifiées ou non, qui modifient profondément leur rôle et leur activité biologique. La glycosylation se passe essentiellement dans l'appareil de Golgi et dans le réticulum endoplasmique, où des glycosyl-transférases fixent sur la chaîne peptidique des résidus présents sous forme d'UDP ou GDP - glucides. Les enzymes peuvent être très spécifiques, car les antigènes de groupes sanguins sont synthétisés de la même manière (70).

On retrouve dans les glycoprotéines, deux principaux types de liaisons osidiques : une liaison N-glycosidique entre la N-acétylglucosamine et un résidu asparagine, et une liaison O - glycosidique entre la N - acétylgalactosamine et un résidu thréonine ou sérine de la protéine.

Ces liaisons semblent s'établir à des endroits bien précis de la protéine et on a conclu à la présence de "séquences codes" qui régissent la fixation d'un résidu glucidique. La liaison N - glycosidique serait liée à la présence de la séquence - Asn-X - Thr/Ser (7) et la liaison O - glycosidique à la présence de la séquence Thr-X-X-Pro (72).

La partie glucidique de la caséine K, située dans le caséinoglycopeptide, est fixée à la chaîne peptidique par une liaison O - glycosidique sur un résidu threonyl en position n° 26 ou 28, à partir de l'extrémité N -terminale du caséinoglycopeptide (72).

Un autre facteur important, d'origine physiologique, de la variation de composition des protéines est le démarrage de la lactation au moment de la parturition. La lactogénèse est un phénomène très complexe qui commence à être connu sous ses différents angles, depuis les mécanismes hormonaux qui entraînent la sécrétion lactée, jusqu'aux différentes modifications biochimiques intervenant dans les cellules sécrétrices qui libèrent les différents constituants du lait. Il semble que la lactogénèse varie suivant les espèces ; chez la vache, la caséinogénèse est réduite à une période très courte, de l'ordre de quelques jours, alors que pour la caséine humaine, l'évolution est beaucoup plus lente et peut durer 10 à 15 jours (42, 73). Cette évolution au cours de la lactogénèse peut entraîner des variations de la composition des protéines.

1.2 - Modification après la biosynthèse

Dès que les protéines du lait sont synthétisées, un certain nombre d'interactions entre les différents constituants du lait interviennent, ce qui entraîne une modification des protéines dès la fin de leur biosynthèse.

66

MORENO et KOSIKOWSKI (74) ont montré que la caséine β isolée en solution subit une hydrolyse qu'ils attribuent à une β -caséine-protéase. Cet enzyme, qui possède une activité protéolytique maximum à pH 5.5, serait une protéase étroitement associée à la caséine β . GROVES et al. (75) ont montré que les caséines γ , TS, R et S sont des fragments plus ou moins importants de la molécule de la caséine β . Cette protéine serait donc partiellement protéolysée dès la fin de sa biosynthèse, alors qu'elle se trouve encore dans la glande mammaire, par un enzyme ayant une spécificité comparable à celle de la trypsine.

Le lait contient deux phosphatases. La plus connue est la "phosphatase alcaline" qui est une phosphomonoestérase dont l'optimum d'activité se situe vers pH 9,5 - 10. Il est probable qu'elle n'a que très peu d'activité dans le lait dont le pH est de l'ordre de 6,7. La "phosphatase acide" est plus précisément une phosphoprotéine phosphatase dont le pH optimum se situe vers 4,5. On pense généralement qu'elle peut déphosphoryler la caséine en milieu légèrement acide, bien qu'elle soit plus active sur d'autres substrats.

A côté des phénomènes de dégradation des protéines qui ont lieu dans le lait dès sa biosynthèse, une incorporation d'acides aminés est possible dans les protéines du lait après la traite. Cette incorporation, comme cela a été montré par l'emploi d'acides aminés marqués (20), bien que limitée, prouve que la biosynthèse peut continuer en dehors de la glande mammaire.

1.3 - Modifications pendant le traitement des protéines .

Depuis leur milieu naturel jusqu'aux analyses diverses qu'elles subissent, les protéines sont soumises à un certain nombre de traitements chimiques et physiques

qui modifient plus ou moins leur structure spatiale, donc leurs propriétés et même leur composition. Dans chaque investigation, de grandes précautions sont prises afin de réduire au maximum ces modifications mais elles sont difficiles à éviter totalement. Nous allons énumérer un certain nombre de manipulations qui peuvent induire une modification de la protéine étudiée.

Le lait prélevé doit être refroidi très rapidement vers 0° afin d'éviter la croissance des bactéries qui pourraient dégrader les protéines. Par ailleurs l'addition d'un antiseptique volatil, tel que le toluène ou le thymol, ralentit le développement des germes qui peuvent se trouver dans le lait.

Les protéines doivent être maintenues dans des milieux de pH bien précis. En effet, en dehors de certaines limites, elles subissent des modifications qui vont jusqu'à des changements de composition chimique. On peut citer en exemple la déphosphorylation de la caséine K en milieu alcalin (76). Les modifications des protéines dues à des valeurs extrêmes du pH sont parfois utiles ; par exemple c'est en abaissant le pH vers 2.0 que l'on active la prochymosine lors de l'obtention de la chymosine que nous avons utilisée dans nos expériences.

La dessiccation des protéines entraîne souvent des modifications de leurs propriétés, surtout perte d'activité et baisse de solubilité. Même des traitements très utilisés pour les solutions protéiques, tels que la congélation ou la lyophilisation, peuvent entraîner des modifications de la protéine. Ainsi nous avons signalé la perte d'activité galactosyl-transférase de la protéine A de la lactose-synthétase après congélation et lyophilisation (77).

L'utilisation d'agents dissociants tels que l'urée ou le chlorhydrate de guanidine au cours des différentes préparations et purifications modifie la structure spatiale des protéines. Il en est de même pour les agents réducteurs tels que le mercapto-éthanol.

Les différentes opérations de purification et d'analyse des protéines sont généralement faites en présence d'oxygène, ce qui entraîne une oxydation de certains composants des protéines. On peut citer par exemple l'oxydation de la méthionine et de la cystéine qui disparaissent plus ou moins au cours des analyses, malgré les précautions qui sont prises pour éviter ces dégradations.

La conservation des protéines sous forme déshydratée et à température ordinaire peut entraîner des modifications de composition. On a ainsi signalé la disparition électrophorétique de la caséine K_B au profit de la caséine K_A de buffle au cours du stockage pendant de longues périodes (78). Par ailleurs, nous avons remarqué nous-mêmes une protéolyse lente de la caséine K conservée sèche à la température du laboratoire.

1.4 - Valeur des résultats analytiques

Un élément important dont il faut tenir compte pour estimer les variations de composition des protéines est la précision et la reproductibilité des analyses et des mesures. En effet, même en essayant de réduire au maximum les causes de variations par des analyses faites en série avec les mêmes réactifs et les mêmes opérateurs, on observe toujours une variabilité dans les résultats. Ces variations peuvent parfois masquer des variations de composition de faible amplitude.

2 - Variation de la composition de la caséine K

2.1 - Comparaison de la caséine K provenant de troupeaux de races différentes

Les teneurs en acides aminés des différents caséinoglycopeptides que nous avons analysés sont relativement constantes. On note cependant quelques variations pour l'alanine et la leucine dans les deux troupeaux, mais ces variations sont de faible amplitude. De plus nous avons mis en évidence une différence pour la teneur en acide glutamique selon la race. Cette différence, de l'ordre de un résidu, que l'on retrouve tout au long de l'étude, est difficilement explicable (courbes approximativement parallèles sur la figure 4).

La partie non peptidique ne présente pas de différence significative entre les deux troupeaux. La teneur en phosphore du caséinoglycopeptide est la plus élevée en été. On sait que la teneur en phosphore du lait de vache est liée à plusieurs facteurs zootechniques ; GUEGUEN et JOURNET (79) ont montré que le lait était plus riche en phosphore en début et fin de lactation ; de plus, VANSCHOU BROEK (80) a montré que la saison pouvait avoir une influence sur la teneur en phosphore qui semble être plus faible à la fin de la période de pâturage. La combinaison de ces différents facteurs, liée à l'hypothèse selon laquelle l'activité phosphorylasique varierait, pourrait expliquer nos résultats. Les teneurs en glucides du caséinoglycopeptide ne sont pas constantes, mais ne présentent pas de tendance générale de variation. Il est difficile d'en déterminer l'origine.

2.2 - Comparaison des variants génétiques de la caséine K

On a observé (tableau 8) des variations significatives de teneur, dues à la période de prélèvement, pour

la plupart des acides aminés. Il est à noter cependant que ces variations ne sont pas de grande amplitude ; en effet l'intervalle de confiance, pour une sécurité de 95%, est au maximum de 0.98 résidu pour la proline, acide aminé présentant la plus grande variabilité.

En comparant statistiquement les compositions en acides aminés des caséines K_A et K_B , on ne retrouve de différences que pour l'acide aspartique, alors que, d'après les travaux de HILL et al. (60), nous aurions dû mettre en évidence des différences pour la thréonine, l'alanine et l'isoleucine en plus de l'acide aspartique. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'acide aspartique ne présente pas de variations dues à la période de prélèvement alors que pour les trois autres acides aminés, on note des variations significatives à 5% ou à 1%. Ces variations sont suffisantes pour masquer les différences existant entre les variants génétiques, différences qui sont en fait de un résidu par môle.

Les matrices de corrélation ne montrent pas de tendance commune de variation pour les deux variants génétiques. On note même des coefficients de corrélation de signes différents entre la proline et l'acide glutamique pour les deux types de caséine K. Les variations de composition semblent donc être aléatoires et il ne se dégage pas de tendance générale.

Les teneurs en phosphore des caséines K sont plus élevées au printemps ; cette variation concorde avec celle notée dans le paragraphe précédent (§ 2.1) ; elle pourrait être expliquée de la même manière.

Les teneurs en glucides sont relativement constantes et ne semblent pas présenter de tendance générale de variations. On ne retrouve des corrélations entre le phosphore, les oses neutres et l'acide sialique que pour la caséine K_A .

Il ne semble donc pas que ces relations soient importantes.

Les rapports molaires des oses montrent une variabilité plus grande pour les oses neutres que pour les autres glucides. De ces différentes données il ressort que les rapports molaires des glucides composant la partie glycanique de la caséine K sont en moyenne :

- oses neutres	2
- osamines	1
- acide sialique	1

Ces résultats sont en accord avec ceux de FIAT et al. (65) selon lesquels le caséinoglycopeptide contient deux résidus galactose par chaîne glycanique. La position de ce résidu pourrait être fixé sur la chaîne glycanique au résidu galactose ou au résidu N- acetyl-galactosamine, comme l'a proposé JOLLES et al. (72).

En conclusion, notre étude de la variation de composition de la caséine K ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences significatives. Les variations que nous avons notées au cours d'une étude portant sur deux années sont faibles et peuvent s'expliquer par la difficulté de l'analyse de la caséine K. En effet, les nombreuses déterminations effectuées sur cette caséine montrent une certaine variabilité due à l'analyse, qui peut éventuellement masquer de faibles variations de composition. Mais nos résultats sont cependant suffisamment précis pour mettre en évidence d'éventuelles variations importantes. Or nous n'en avons jamais noté d'aussi importantes que celles mentionnées par KIRCHMEIER (18) qui, par exemple, montre une variation de 4 résidus pour l'acide glutamique dans le caséinoglycopeptide. Il est probable que la caséine est synthétisée suivant les lois du code génétique, sans présenter les "variants métaboliques" mentionnés par cet auteur.

La variabilité notée ci-dessus peut être due à la préparation des échantillons, qui demande un certain nombre de manipulations pouvant provoquer une oxydation plus ou moins marquée, ou à l'analyse elle-même. La dispersion des résultats obtenus doit être due à la présence de glucides dans la molécule de caséine K. Les glucides peuvent réagir avec les acides aminés au cours des différentes étapes du dosage.

3 - La caséine de colostrum

Les diagrammes électrophorétiques obtenus avec la caséine entière, avec la caséine K et avec le caséinoglycopeptide libéré par la chymosine, ne sont pas exactement les mêmes selon que les substances proviennent du premier colostrum ou du lait normal. Ces différences de comportement peuvent traduire des changements dans la structure primaire (substitution d'acides aminés), dans la composition de la partie prosthétique glucidique, ou dans la structure spatiale.

Nous avons observé une grande analogie mais non pas une identité complète de composition en acides aminés de la caséine K totale et du caséinoglycopeptide entre la période colostrale et le lait normal. On ne peut cependant pas affirmer d'emblée que les chaînes peptidiques sont différentes.

Les acides aminés de la séquence C - terminale étant les mêmes, on peut en déduire que la chaîne peptidique est achevée dès le début de la sécrétion. Par action de la carboxypeptidase nous connaissons les quatre acides aminés de la fin de la chaîne unique de la caséine K ; mais une récente détermination de l'enchaînement par un "séquen-cer" (81) a montré l'identité d'une longue séquence de 42 acides aminés entre le caséinoglycopeptide du colostrum et celui du lait normal (tableau 18). (La détermination

de cette séquence a été réalisée par Madame J. JOLLES, Université de Paris VI). De ce fait, la probabilité d'une chaîne peptidique différente devient faible. Les écarts constatés dans l'analyse des acides aminés après hydrolyse acide totale peuvent résulter d'artefacts analytiques, par exemple de la destruction ou de l'oxydation de certains résidus qui pourrait être plus rapide dans la caséine K de colostrum (la faible teneur en tyrosine pourrait s'expliquer ainsi). Mais il ne peut être exclu a priori qu'une impureté glycopeptidique soit présente dans la caséine K de colostrum et non dans celle du lait normal.

Il est à noter que le caséinoglycopeptide de colostrum est caractérisé, comme celui du lait normal par l'absence d'acides aminés aromatiques, d'histidine et d'arginine (64).

La phosphorylation de la caséine K ne paraît pas être influencée par le passage de la période colostrale à la sécrétion normale. Les teneurs en phosphore, en effet, ne présentent pas de variations notables avec le temps écoulé depuis le vêlage, aussi bien pour la caséine K que pour le caséinoglycopeptide.

Les teneurs en composants glucidiques de la caséine K de colostrum sont plus grandes que dans la caséine normale ; elles sont environ le double pour les oses neutres et les osamines. Il en va de même avec la composition du caséinoglycopeptide . Mais il faut remarquer que le nombre de résidus glucidique par mole ne concorde pas entre la caséine K et le caséinoglycopeptide qui en est issu ; dans ce dernier ils sont environ deux fois plus élevés. On sait aujourd'hui que la caséine K est un mélange de "variants glucidiques", c'est-à-dire de chaînes polypeptidiques identiques plus ou moins glycosylées (82), certaines ne l'étant pas du tout. Ces dernières sont peu

Tableau 18 - Séquence N - terminale du caséinoglycopeptide du colostrum déterminé à l'aide d'un séquenceur (travail de J. Jollès) (81). La séquence du caséinoglycopeptide normal, selon Jollès et al. (72) est identique.

Colostrum [*]	1	Met - Ala - Ile - Pro - Pro - Lys - Lys - Asn							
(a)		+	+	+	+	+			+
(b)							+	+	
(c)		45	28	25	20	16	15	18	8
Colostrum [*]	9	Gln - Asp - Lys - Thr - Glu - Ile - Pro - Thr							
(a)		+	+		+	+	+	+	+
(b)				+					
(c)		12	10	8		12	9	6	
Colostrum [*]	17	Ile - Asn - Thr - Ile - Ala - Ser - Gly - Glu							
(a)		+	+	+	+		+	+	+
(b)						+			
(c)		8	4		6	7		6	6.5
Colostrum [*]	25	Pro - Thr - Ser - Thr - Pro - Thr - Ile - Glu							
(a)		+	+	+	+	+	+	+	+
(b)									
(c)		1						0.6	
Colostrum [*]	33	Ala - Val - Glu - Ser - Thr - Val - Ala - Thr							
(a)			+	+	+	+	+		+
(b)		+						+	
(c)									
Colostrum [*]	41	Leu - Glu							
(a)		+	+						
(b)									
(c)		0.2							

- * (a) PTH - amino acide déterminé par chromatographie sur couche mince dans le solvant chloroforme : méthanol (90 : 10, v/v) suivi de chloroforme seul.
- (b) PTH - Ala et PTH-Lys, non séparés dans le solvant précédent, sont séparés dans le solvant heptane : acide propionique : dichlorethane (58 : 17 : 25, v/v/v).
- (c) Acide aminé déterminé par Autoanalyzer après régénération, % de récupération.

solubles dans l'acide trichloracétique à 12%, ce qui fait que le réactif provoque un certain fractionnement - (83). Le caséinoglycopeptide isolé de cette manière est plus riche en glucides que les peptides totaux libérés par la chymosine ; ce qui explique les écarts observés. L'évolution de la teneur en glucides au cours de la phase postpartum se fait dans le sens d'une diminution des teneurs en oses pour atteindre les valeurs normales 24 heures à 28 heures après le vêlage. La présence de glucosamine à côté de la galactosamine dans le caséinoglycopeptide de colostrum démontre une glycosylation de la caséine K différente au début de la lactation. Une liaison N - glycosidique entre la N - acetylglucosamine et l'asparagine semble exclue car on ne retrouve pas dans la séquence du caséinoglycopeptide normal la séquence code Asn- X - Thr/Ser nécessaire pour une telle liaison (71).

En outre, l'absence d'une telle séquence-code ne permet pas d'imaginer la fixation de nucléotides trisaccharides de la forme UDP -N-Acetylglucosamine-Galactose-Acide N- acétylneuraminique identiques à ceux qui ont été identifiés libres dans le colostrum de brebis (84) alors qu'ils n'existent pas dans le lait normal. Il semble donc que la structure des chaînes glucidiques de la caséine K de colostrum soit plus complexe que celles proposées par TRAN et BAKER (85) et par FIAT et al. (65, 72) pour la caséine K normale.

L'étude de l'action de la chymosine sur la caséine entière de colostrum met en évidence une libération à peu près deux fois plus importante d'azote soluble dans l'acide trichloracétique 12% pendant les 36 heures qui suivent la parturition. Les dosages d'acide neuraminique sur la caséine entière de colostrum confirment cette augmentation et il existe une corrélation significative à 1% entre les

deux critères d'investigation.

Les particularités de la caséine K de colostrum disparaissent rapidement et on peut considérer que 36 heures après la parturition, la caséine K est normale. Ce temps d'évolution de la caséine K au cours de la phase colostrale est à comparer à celui, beaucoup plus long, de l'évolution de la caséine humaine dans le colostrum ; dans ce cas, on observe une image électrophorétique normale de la caséine entière 10 à 15 jours seulement après la parturition (42, 73).

La caséine K de colostrum semble avoir une structure glucidique plus complexe que celle de la caséine K normale. Ceci pourrait expliquer les différences mises en évidence par électrophorèse.

- R E S U M E - ---

Le présent travail comporte les parties suivantes :

1 - Etude des variations de la composition de la caséine K.

2 - Composition de la caséine K de colostrum.

1 - L'étude de la composition de la caséine K venant du lait de deux troupeaux de race différente n'a pas montré de différence significative, selon l'origine du lait, tant pour la partie peptidique que pour la partie non peptidique. Les faibles variations notées sur chaque série de caséines ne peuvent être attribuées à une synthèse variable de la protéine, mais plutôt aux manipulations que subit l'échantillon ou aux erreurs dues à l'analyse. Seule, la teneur en phosphore semble être liée à la saison ; elle est plus élevée en été. Ceci pourrait être en relation avec l'alimentation des animaux.

La comparaison des variants génétiques de la caséine K provenant de deux vaches homozygotes n'a vérifié que très partiellement les substitutions d'acides aminés déterminées par d'autres auteurs. Seule, une différence au niveau de l'acide aspartique est notée, alors qu'il devrait exister une différence aussi au niveau de la thréonine, de l'alanine et de l'isoleucine. De faibles variations (inférieures à un résidu par mole) sont mises en évidence pour dix acides aminés dans la caséine K_A et cinq acides aminés dans la caséine K_B. Les variations sont sans doute dues aux imprécisions de l'analyse. La composition de la partie non peptidique varie peu. On retrouve un maximum en

été, pour le phosphore.

L'analyse de la partie peptidique de la caséine K présente des difficultés dues probablement à la présence de glucides dans la molécule : ceci peut expliquer de faibles différences de composition.

2 - La caséine K de colostrum prélevée de 0 à 30 h après la parturition présente une image électrophorétique anormale. La composition et la structure de sa chaîne peptidique sont normales dès la parturition. Par contre, la caséine K de colostrum possède une partie glucidique plus importante que la caséine K normale. Les rapports molaires des différents glucides de la partie glycanique sont constants. Nous avons mis en évidence la présence de N-acetylglucosamine à côté de la N-acetylgalactosamine, qui est seule présente dans la caséine K normale. Cette anomalie glucidique des premières heures après la parturition ne gêne pas l'action de la chymosine. La phosphorylation de la caséine K de colostrum est normale depuis la mise-bas.

- B I B L I O G R A P H I E -

- 1 - BRACONNOT H. - (1830) Ann. Chimie Physique, 43,
337 - 351.
- 2 - HAMMARSTEN O. - (1883) Z. Physiol. Chem., 7, 227.
- 3 - HAMMARSTEN O. - (1885) Z. Physiol. Chem., 9, 273.
- 4 - OSBORNE T.B. et WAKEMAN A. - (1918), J. Biol. Chem.,
33, 7.
- 5 - LINDERSTROM-LANG L. et KODAMA S. - (1925), C.R.
Trav. Lab. Carlsberg, 16, (1).
- 6 - LINDERSTROM-LANG L. - (1929) C.R. Trav. Lab.
Carlsberg, 17, (9).
- 7 - CHERBULIEZ E. et SCHNEIDER M.C. - (1932), Helv.
Chim. Acta, 15, 597.
- 8 - CHERBULIEZ E. et BAUDET P. - (1933), Helv. Chim.
Acta., 16, 600.
- 9 - MELLANDER O. - (1939) Biochem. Z., 300, 240.
- 10 - THOMPSON M.P. - (1968), Agric. Science Review, 6,
(1), 29 - 33.
- 11 - DYSON ROSE, BRUNNER J.R., KALAN E.B., LARSON B.L.
MELNYCHYN P., SWAISGOOD H.E et WAUGH D.F. -
(1970), J. Dairy Sci., 53, (1), 1-17.
- 12 - GORDON W.G., SEMMETT W.F., CABLE R.S. et MORRIS M. -
(1949), J. Am. Chem. Soc., 71, 3293.
- 13 - KUGENEV P.V. - (1959), XVè Congrès Intern. de
laiterie (Londres), 3, 1653.
- 14 - KIERMEIER P. et KIRCHMEIER O. - (1963) Biochem. Z.,
337, 519 - 524.
- 15 - LINDQVIST B. - (1968) Thèse, Stockholm, Suède.
- 16 - FEATHERSTON W.R., FRAZEUR D.R., HILL D.L., NOLLER C.H.
et PARMELEE C.E. - (1964), J. Dairy Sci., 47,
1417-1418.

- 17 - KIRCHMEIER O. - (1967), Z. Lebensmitt - Untersuch., 135, (4), 181-192.
- 18 - KIRCHMEIER O. - (1968), Hoppe - Zeyler's Z. Physiol. Chem., 349, 29-36.
- 19 - ALAIS C. et BLANC B. - (1973) World Review of Nutrition and Dietetics, 20 (sous presse)
- 20 - MAJUMDER G.C. et GANGULI N.C. - (1967) Milchwissenschaft, 22, (6), 482-489.
- 21 - JOLLES J., JOLLES P. et ALAIS C. - (1969) Nature, 222, (5194), 668 - 670.
- 22 - DECAEN C., JOURNET M. et POUTOUS M. - (1970), Ann. Zootech., 19, (2), 191 - 203.
- 23 - MAYER W. - (1969) Thèse, München.
- 24 - Mc DOUGALL E.I. - (1965) Biochem J., 94, 99 - 100
- 25 - MINIERI L. et INTRIERI F. - (1968) Acta Medica Veterin., 14, (6) 449-521.
- 26 - MONTEMURRO O., CIANCI D. et CIRRUZZI B. - (1970) Ann. Fac. Agr. Univ. Bari., 24, 373 - 387.
- 27 - RIBADEAU-DUMAS B. et VEAUX Monique - (1964) J. Dairy Sci., 31, 189 - 193.
- 28 - KIM Y.K., ARIMA S. et HASHIMOTO Y. - (1966) Jap. J. Zootech. Sci., 37, (1), 32 - 40.
- 29 - KNOOP E. et WORTMANN A. - (1967) Milchwissenschaft, 22, 198 - 205.
- 30 - REYNOLDS M. et FOLLEY S.J. - (1969) "Lactogenesis : The initiation of milk secretion at parturition" University of Pennsylvania Press, Philadelphie.
- 31 - BARGMANN W. et WELSCH U. - (1968) in "Lactogenesis : the initiation of milk secretion at parturition" édité par M. REYNOLDS et S.J. FOLLEY - Philadelphie. University of Pennsylvania Press, 42 - 52.
- 32 - TURKINGTON R.W. - (1968), Endocrinology, 82, 575.

- 33 - GARNIER J. - (1957), Proc. Intern., Symposium Enzyme Chem. Tokyo, 525.
- 34 - WAKE R.G. - (1957) Austr. J. Science, 20, 167.
- 35 - WAUGH D.H. et HIPPEL P.H. - (1956) J. Amer Chem. Soc. 78, (4), 576.
- 36 - DELFOUR A., JOLLES J., ALAIS C., et JOLLES P. - (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm., 19, 452 - 455.
- 37 - DELFOUR A., ALAIS C. et JOLLES P. - (1966) Chimia (Aarau), 20, 148 - 150.
- 38 - JOLLES P. - (1966), Angew. Chem. (Intern. Ed.) 5, 558 - 566.
- 39 - JOLLES J., ALAIS C. et JOLLES P. - (1968) Biochim. Biophys. Acta., 168, 591 - 593.
- 40 - JOLLES P., ALAIS C. et JOLLES J. - (1962) Arch. Biochem. Biophys., 98, 56-57.
- 41 - NITSCHMANN H.S. et LEHMANN W. - (1947) Helv. Chim. Acta., 30, 804.
- 42 - ALAIS C. et JOLLES P. - (1970), Int. J. Biochem. 1, (5), 546 - 552.
- 43 - Mc KENZIE H.A. et WAKE R.G. - (1961) Biochim. Biophys. Acta, 47, 240.
- 44 - YAGUCHI M., DAVIES D.T. et KIM Y.K. - (1968) J. Dairy Sci., 51, (4), 473 - 477.
- 45 - ALAIS C. et JOLLES P. - (1961) Biochim. Biophys. Acta 51, 315-322.
- 46 - WAKE R.G. et BALDWIN R.L. - (1961) Biochim. Biophys. Acta., 47, 225.
- 47 - POULIK M.D. - (1957) Nature 180, 1477.
- 48 - NEELIN J.M. - (1964) J. Dairy Sci., 47, 506- 509.
- 49 - ALAIS C., MOCQUOT G., NITSCHMANN Hs. et ZAHLER P. - (1953), Helv. Chim. Acta., 36, 1955.
- 50 - FRIEDRICH A. - (1939), "Microanalyse organique quantitative" trad. A. Lacourt, p. 140 (Dunod édit.) Paris.

- 51 - BAMANN E., NOVOTNY E. et ROHR L. - (1948) Chem. Ber., 81, 438.
- 52 - SCHULTZE H.E., SCHMIDTBERGER R. et HAUPT H. - (1958) Biochem. Z., 329, 490 - 507
- 53 - RONDLE C.J. et MORGAN W.T.J. - (1955) Biochem. J., 61, 586.
- 54 - GHUYSEN J.M. et SALTON M.R.J. - (1960) Biochim. Biophys. Acta., 40, 462 - 472.
- 55 - GARDELL S. - (1953) Acta. Chem. Scand., 7, 207.
- 56 - WARREN L. - (1959) J. Biol. Chem., 234, 1971.
- 57 - SVENNERHOLM L. - (1958), Acta. Chem. Scand., 12, 547.
- 58 - PIEZ K.A. et MORRIS L. - (1960) Anal. Biochem., 1, 187.
- 59 - MERCIER J.C., URO J., RIBADEAU-DUMAS B. et GROSCLAUDE F. - (1972) Eur. J. Biochem. 27, 535 - 547.
- 60 - HILL R.J., NAUGHTON M.A. et WAKE R.G. - (1970) Biochim. Biophys. Acta., 200, 267 - 274.
- 61 - MERCIER J.C., BRIGNON G. et RIBADEAU-DUMAS B. - (1973), Eur. J. Biochem., 35, 222 - 235.
- 62 - ALAIS C. - (1963) Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys., 3, (4), 391 - 404.
- 63 - RIBADEAU-DUMAS B. - (1968) Biochim. Biophys. Acta. 168, 274 - 281.
- 64 - JOLLES P., ALAIS C. et JOLLES J. - (1961) Biochim. Biophys. Acta., 51, 309 - 314.
- 65 - FIAT A.M., ALAIS C. et JOLLES P. - (1972) Eur. J. Biochem., 27, 408 - 412.
- 66 - MARIER J.R., TESSIER H. et ROSE D. - (1963) J. Dairy Sci., 46, (5), 373 - 379.
- 67 - TURKINGTON R.W. et TOPPER Y.J. - (1966) Biochim. Biophys. Acta., 127, 366 - 372.
- 68 - MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. et RIBADEAU-DUMAS B. - (1971) Eur. J. Biochem., 23, 41 - 51.

- 69 - GROVES M.L. et GORDON W.G. - (1970) Arch. Biochem. Biophys., 140, 47 - 51.
- 70 - GROLLMAN E.F., KOBATA A. et GINSBURG V. - (1969) J. Clin. Invest., 48, 1489.
- 71 - HUNT L.T. et DAYHOFF M.O. - (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 757.
- 72 - JOLLES J., FIAT A.M., ALAIS C. et JOLLES P. - (1973) FEBS Lett. 30, (2), 173 - 176.
- 73 - MALPRESS F.H. et HYTTEN F.E. - (1964) Biochem. J., 91, 130 - 136.
- 74 - MORENO V. et KOSIKOWSKI F.V. - (1972) Milchwissenschaft 27, (7), 433 - 436.
- 75 - GROVES M.L., GORDON W.G., KALAN E.B. et JONES S.B. - (1973), J. Dairy Sci., 56, (5), 558 - 568.
- 76 - FIAT A.M., ALAIS C. et JOLLES P. - (1968) Chimia (Aarau), 22, 137 - 139.
- 77 - GUERIN J., ALAIS C., VOLFIN P. et JOLLES P. - (1972) C.R. Acad. Sci. Paris, Série D, t. 275, 2267 - 2269.
- 78 - MAJUMDER G.C. et GANGULI N.C. - (1971) Milchwissenschaft, 26, (3), 151 - 153.
- 79 - GUEGUEN L. et JOURNET M. - (1961) Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1, (3), 305 - 310.
- 80 - VANSCHOUBROECK F.X. - (1958) Nederl. Melk. Zuivelt. 12, 12 - 37.
- 81 - GUERIN J., ALAIS C., JOLLES J., et JOLLES P. - (1973) Biochim. Biophys. Acta, en cours de publication.
- 82 - MAC KINLAY A.G. et WAKE R.G. - (1965) Biochim. Biophys. Acta. 104, 167 - 171.
- 83 - ALAIS C., BLONDEL-QUEROIX J. et JOLLES P. - (1964) Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 973 - 980.
- 84 - DENAMUR R. et GAYE P. - (1971) Eur. J. Biochem., 19, 23-35.
- 85 - TRAN V.D. et BAKER B.E. - (1970) J. Dairy Sci. 53, (8), 1009 - 1012.

